



TITLE:

大腸菌および高等植物のフェロキ
レテースに関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

宮本, 一政

CITATION:

宮本, 一政. 大腸菌および高等植物のフェロキレテースに関する研究. 京都大学, 1994, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1994-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3094329>

RIGHT:

学位申請論文

大腸菌および高等植物の
フェロキレテースに関する研究

宮本 一政

目 次

論文要旨	*****	1
序 論	*****	2
材料と方法	*****	1 2
結 果		
第一節 大腸菌可視光感受性変異株における プロトポルフィリンIXの蓄積	***	2 4
第二節 大腸菌フェロキレテースの精製	**	3 3
第三節 植物のフェロキレテース遺伝子の分離と解析	**	5 2
考 察		
第一節 大腸菌可視光感受性変異株における プロトポルフィリンIXの蓄積	***	6 4
第二節 大腸菌フェロキレテースの精製	**	7 0
第三節 植物のフェロキレテース遺伝子の分離と解析	**	7 5
まとめ	*****	7 8
謝 辞	*****	7 9
参考文献	*****	8 0

論文要旨

筆者は、修士課程において大腸菌の可視光感受性の変異株を分離し、その変異が起きている遺伝子(*visA*)を同定し、塩基配列を決定した。その結果、この変異株は、ヘム生合成の最終段階で、プロトヘムの前駆体であるプロトポルフィリンIXに鉄イオンを入れる酵素、フェロキレテース(*ferrochelatase*; *protoheme ferro-lyase*, EC 4. 99. 1. 1)の遺伝子の変異株であると結論した。筆者は、この酵素は酸素呼吸、エネルギー合成、活性酸素消去系などに関与し重要な酵素であると考えた。また、植物においては、プロトポルフィリンIXを共通の前駆体として持つ点から、クロロフィル合成とも関連する酵素として興味を持った。そこで、博士後期課程においてさらに研究を進め、大きく3つの研究を行った。

まず第一に、この可視光感受性変異株でのプロトポルフィリンIXの異常な蓄積を蛍光測定によって確認した。この研究によって、この可視光感受性はプロトポルフィリンIXの蓄積と関連していることを証明した。

第二に、フェロキレテースの立体構造解析を行って反応機構を知るため、大腸菌フェロキレテースの大量発現系を構築し、Blue Sepharose CL-6Bを用いたカラムクロマトグラフィーによって大量精製を行った。一方、精製したフェロキレテースを用いて、活性測定、分子量の測定、ペプチドマッピング、等電点・至適pHの測定、CD測定などの生化学的性質の解析を行った。

第三に、大麦およびキュウリ子葉のcDNAライブラリーから、フェロキレテースの遺伝子を含むクローンの分離に成功し、解析を行った。大腸菌のフェロキレテース遺伝子の欠失変異株ではヘムが作られず、結果として酸素呼吸ができないために成長が悪くなる。この性質を相補するクローンを、cDNAライブラリーから単離し、それらの塩基配列を決定した。それらのORFのアミノ酸配列を、大腸菌や他の生物のフェロキレテースのアミノ酸配列とホモロジーを比較し、これらのcDNAは、フェロキレテースをコードしていると結論した。植物からのフェロキレテース遺伝子の単離とその塩基配列に関する報告は世界で初めてである。

序 論

地球上に生存する生物にとって、光はエネルギー源として、また、情報伝達の媒体として、大変重要なものである。特に植物は、光合成によって太陽光のエネルギーを生命活動を維持するために必要な化学エネルギーへ変換している。動物、細菌類などの他の生物も、このエネルギーを基に生活していることを考えると、光は全ての生物の生命活動の源であると言える。また、光は生物にとって主要な感覚の媒体であって、生物が行動するうえでも重要な役割を担っている。さらに、一部の生物には、生殖行動、捕食などのために自ら発光するものもある。生命発生の第一段階として、原始地球環境において無機物質の中から有機物質が合成した際にも、光が重要な役割を果たしたことが知られている。このようにすべての生物にとって非常に関わりの深い光であるが、それが常に生物にとって有利に働いてきたわけではない。現在、生物が獲得している光合成、視覚などの機能も、もともと有害であったと思われる光を、生物が生存するために、巧みに利用できるように進化してきたものであろう。

また、酸素も生物にとってたいへん重要なものである。特に好気性生物にとっては、酸素呼吸の電子受容体として必須のものであり、酸素分子を利用する能力を獲得できた生物が進化の上で有利な位置を占め、酸素が生物進化の上で大きな原動力の一つとなったことは疑う余地がない(浅田、1988)。しかし、その一方で、酸素も生物にとって有害に働くときもある。最近の研究においては、活性酸素が発癌、動脈硬化、老化等様々な障害・疾患の原因の一つとして注目されている。

光と酸素が細胞に障害を与える一つの例として、ヒトで、遺伝的あるいは後天的な光過敏症であるポルフィリン症が知られているが(Mangus *et al.*, 1961; Langhof *et al.*, 1961; Kappas *et al.*, 1983; 折井、1988)、この病気はプロトポルフィリンIXが血液中などに蓄積し、表皮近くでは光を受けて溶血などの有害な現象を引き起こすために、光過敏症となることが知られている。この

病気の原因はフェロキレテースの欠損であるが、劣性変異の場合(Ruth *et al.*, 1978; Deybach *et al.*, 1986)と優性変異の場合(Bloomer *et al.*, 1987; Tutois *et al.*, 1991)が知られている。また、最近、マウスで劣性変異が、両方の染色体上の遺伝子に変異が起きている場合なども報告されている(Lamoril *et al.*, 1991)。ポルフィリン症になった細胞では、フェロキレテースが欠損していること(Bloomer *et al.*, 1987; Brenner *et al.*, 1992; Ruth *et al.*, 1978)、そのことによって細胞中に前駆体のプロトポルフィリンIXが蓄積していること(Mangus *et al.*, 1961; Langhof *et al.*, 1961)、さらに、プロトポルフィリンIXは光増感体(Allison *et al.*, 1966)として働いて活性酸素を発生し、細胞に障害を与えるだろうということ(Hsu *et al.*, 1971; Kravinovsky, 1979; Poulson *et al.*, 1976)が報告されている。

筆者らの研究室では、以前、ゼニゴケの葉緑体ゲノムの全塩基配列を決定した(Ohyama *et al.*, 1988; Umesono *et al.*, 1988; Fukuzawa *et al.*, 1988; Kohchi *et al.*, 1988)。葉緑体では、可視光の有無によって発現量の変化する遺伝子の存在が知られており、筆者らの研究室では、大腸菌においても同様の遺伝子が存在するかを調べた。その研究の中で、大腸菌には可視光の存在下で転写活性が低くなるようなプロモーターが存在することを見いだした(Nakahigashi *et al.*, 1990)。

この実験中、さらに強い可視光感受性を示す変異株VS101を分離した。ところが、この変異株はプロモーターではなく大腸菌染色体上のある遺伝子(*visA*と命名、後に*hemH*と同一であると判明)に変異が起きて、光感受性(致死)になった株であることが判明した(Miyamoto *et al.*, 1991; Nakahigashi *et al.*, 1991)。そこで、筆者は、修士論文においてこのVS101変異株と同様の変異株を積極的に多数分離し、それらの変異株の性質を調べるとともに光感受性に関与する遺伝子(*visA*)を同定し、その塩基配列を決定した。その結果、酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)の*HEM15*遺伝子(Labbe-Bois, 1990)と、アミノ酸配列のレベルで約28%の相同性を示すことがわかった。*HEM15*遺伝子は酵母のフ

フェロキレテースをコードする遺伝子として解析されたものである。フェロキレテースはヘム生合成(図1)の最終段階でプロトポルフィリンIXに鉄イオン(Fe^{2+})を挿入する反応(図2)を触媒する酵素である(Taketani, 1993)。大腸菌においてフェロキレテースをコードする遺伝子は*hemH*として染色体上11分付近にマップされており(Cox & Charles, 1973)、*visA*の染色体上の位置と一致した。よって、筆者は*visA*遺伝子はフェロキレテースをコードする遺伝子*hemH*と同一のものであると結論した。

ヘムは、哺乳類においてはヘモグロビンに含まれる色素としてよく知られているが、その他にも様々な働きをしている。大腸菌においてもチトクローム、カタラーゼなどヘム蛋白質の構成成分として使われ、酸素呼吸における電子伝達、活性酸素の消去などにおいて、非常に重要な働きをしている。先にも述べたように、ヒトにおいてフェロキレテース遺伝子が欠損すると、前駆体のプロトポルフィリンIXが細胞中に蓄積し、ポルフィリン症になることが知られていて、筆者らが分離したフェロキレテースの欠損変異株も可視光感受性になることから、大腸菌におけるポルフィリン症の株であるということが出来る。

プロトポルフィリンIXは光増感剤(伊藤ら、1988)として知られ、可視光の照射によって、酸素分子から活性酸素を生成する反応を触媒することが知られている(Hsu *et al.*, 1971; Kravinsky, 1979; Poulson *et al.*, 1976)。筆者らの以前の実験(Nakahigashi *et al.*, 1991)では嫌氣的条件の時には可視光感受性は見られず、この可視光感受性には酸素が明らかに関与することが示された。

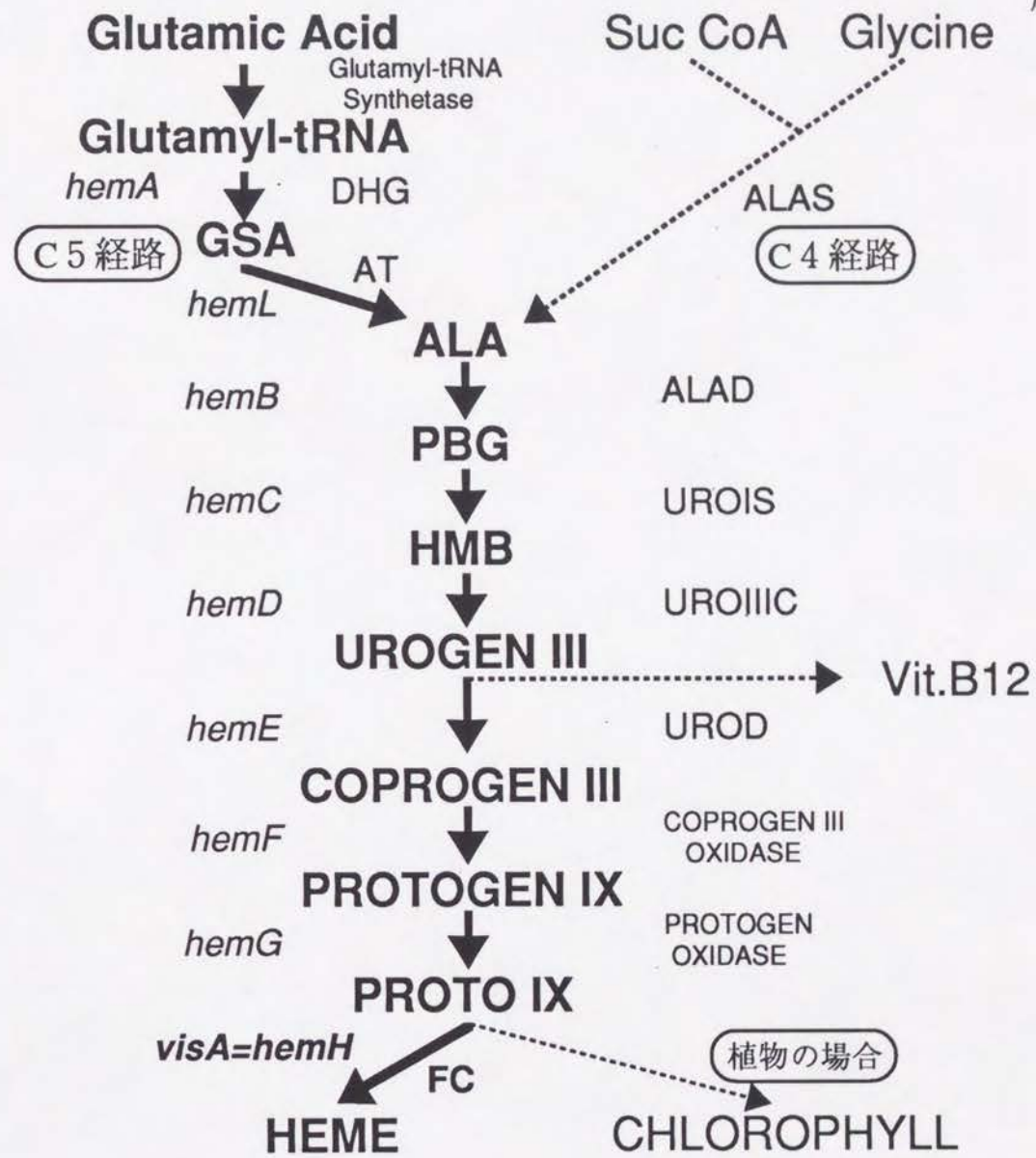
フェロキレテースに関する研究は、ポルフィリン症という病気に関連することから、これまで主に哺乳類について行われていた。筆者は、大腸菌のフェロキレテース変異株の可視光感受性が哺乳類のポルフィリン症と同様の機構で起こっているのかどうかを究明することに興味を持ち、まず、大腸菌可視光感受性変異株でのプロトポルフィリンIXの蓄積を確認した。大腸菌では変異株の分離・解析が容易に行えることから、ポルフィリン症の研究、フェ

ロキレテースの反応機構の研究、細胞に対する活性酸素の影響の研究、ヘム生合成系全般を理解する研究などに有利であると考え、大腸菌の可視光感受性株を用いて、フェロキレテースの研究を進めることにした。

大腸菌におけるヘム生合成系は図1に示した通りである。ヘム生合成はグルタミン酸から始まり、グルタミン酸tRNAから*hemA*、*hemL*の遺伝子産物によって δ -アミノレブリン酸(ALA)が合成される(C5経路)(O'Neil & Söll, 1990; Jahn *et al.*, 1991; Ilag *et al.*, 1991)。動物や光合成細菌の場合には、グリシンとスクシニルCoA(補酵素A)からALA合成酵素の働きでALAが合成される(C4経路)(Gibson *et al.*, 1958; Marver *et al.*, 1966; Leong *et al.*, 1982; Sasake *et al.*, 1987)。大腸菌の場合は普段はC5経路で合成されるが、ALA合成酵素の遺伝子が導入・発現された場合にはC4経路での合成も可能である(Li *et al.*, 1989a)。ALAからさらに数段階を経てプロトポルフィリンIXが合成され、フェロキレテースの働きによってヘムが合成される(図2)。ヘム生合成系の遺伝子の大腸菌染色対上でのマッピングは以前から行われており(Bachmann *et al.*, 1990; Săsărman *et al.*, 1968a; Săsărman *et al.*, 1968b; Powell *et al.*, 1973; Cox & Charles, 1973; Săsărman *et al.*, 1975; Chartrand *et al.*, 1979; Săsărman *et al.*, 1979; Li *et al.*, 1988)、さらに、最近になって、*hemA*~*hemE*、*hemH*、*hemL*の遺伝子配列が次々と同定されている(*hemA*: Drolet *et al.*, 1989; *hemA*: Li *et al.*, 1989; *hemL*: Ilag *et al.*, 1991; *hemB*: Echelard *et al.*, 1988; *hemC*: Thomas *et al.*, 1986; *hemD*: Săsărman *et al.*, 1987; *hemD*: Joadan *et al.*, 1988; *hemE*: Nishimura *et al.*, 1992; *hemH*: Miyamoto *et al.*, 1991)。大腸菌*hemH*変異株は可視光感受性になるが、その復帰変遺体を分離すると*hemA*~*hemG*のヘム生合成系の前の段階の遺伝子に変異が起こったものが多数分離できた。これは、*hemA*~*hemG*の遺伝子に変異が起こることによって、可視光感受性の原因となっているプロトポルフィリンIXが合成されなくなるためである。*hemE*遺伝子はそのような復帰変異株の解析の中から、筆者らの研究室で同定したものである(Nishimura *et al.*, 1992)。さらに、*hemG*遺伝子についても現在解析中である。

このように、大腸菌のフェロキレテースの変異株は、ヘム生合成系全般の解明に寄与している。

植物においては、C5経路で合成されたプロトポルフィリンIXにマグネシウムが挿入されて、マグネシウムプロトポルフィリンIXとなり(Fuesler *et al.*, 1984a)、さらに側鎖の置換、五員環の形成、炭化水素鎖の付加など数段階を経てクロロフィルが合成される。ヘム生合成およびクロロフィル合成については文献(*Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*, Dailey, 1990)に解説されている。フェロキレテースの基質であるプロトポルフィリンIXは、植物においては同時にマグネシウムキレテースの基質であり、クロロフィルの前駆体となっている。つまり、植物においては、ヘム生合成とクロロフィル合成は、途中のプロトポルフィリンIXまで同じ経路をたどり、プロトポルフィリンIXに鉄が入るかマグネシウムが入るかによって、ヘムとクロロフィルが合成されていく。マグネシウムキレテースについては活性の測定(Smith & Rebeiz, 1977)、細胞内での位置の研究(Fuesler *et al.*, 1984b)、活性へのATP要求性(Pardo *et al.*, 1980)などが報告されているが、酵素の精製、遺伝子の同定などはまだ報告されていない。プロトポルフィリンIXは、ヘム・クロロフィルという生理的に非常に重要な二つの物質の共通の前駆体であり、その分岐点の片方に位置するフェロキレテースは重要な酵素であり、その解析を進めることはヘム生合成ばかりでなくクロロフィル合成を理解する上にも貢献するものと思われる。



物質および酵素名の略号は以下の通りである。

物質名

- Suc CoA, succinyl-CoA
- GSA, glutamate-1-semialdehyde
- ALA, δ -aminolevulinic acid
- PBG, porphobilinogen
- HMB, hydroxymethylbilane
- UROGEN III, uroporphyrinogen III
- Vit. B12, vitamin B12
- COPROGEN III, coporphyrinogen III
- PROTOGEN IX, protoporphyrinogen IX
- PROTO IX, protoporphyrin IX

酵素名

- ALAS, ALA synthase
- ALAD, ALA dehydratase
- DHS, dehydrogenase
- AT, aminotransferase
- UROIS, uroporphyrinogen-I synthase
- UROIII C, uroporphyrinogen-III cosynthase
- UROD, uroporphyrinogen-III decarboxylase
- FC, ferrochelatase

図1 ヘム生合成の経路

太線は大腸菌におけるヘム生合成系の経路である。大腸菌や植物は主にC5経路で、動物などの場合はC4経路でALAが合成される。植物においてはプロトポルフィリンIXから分岐してクロロフィルが合成される。

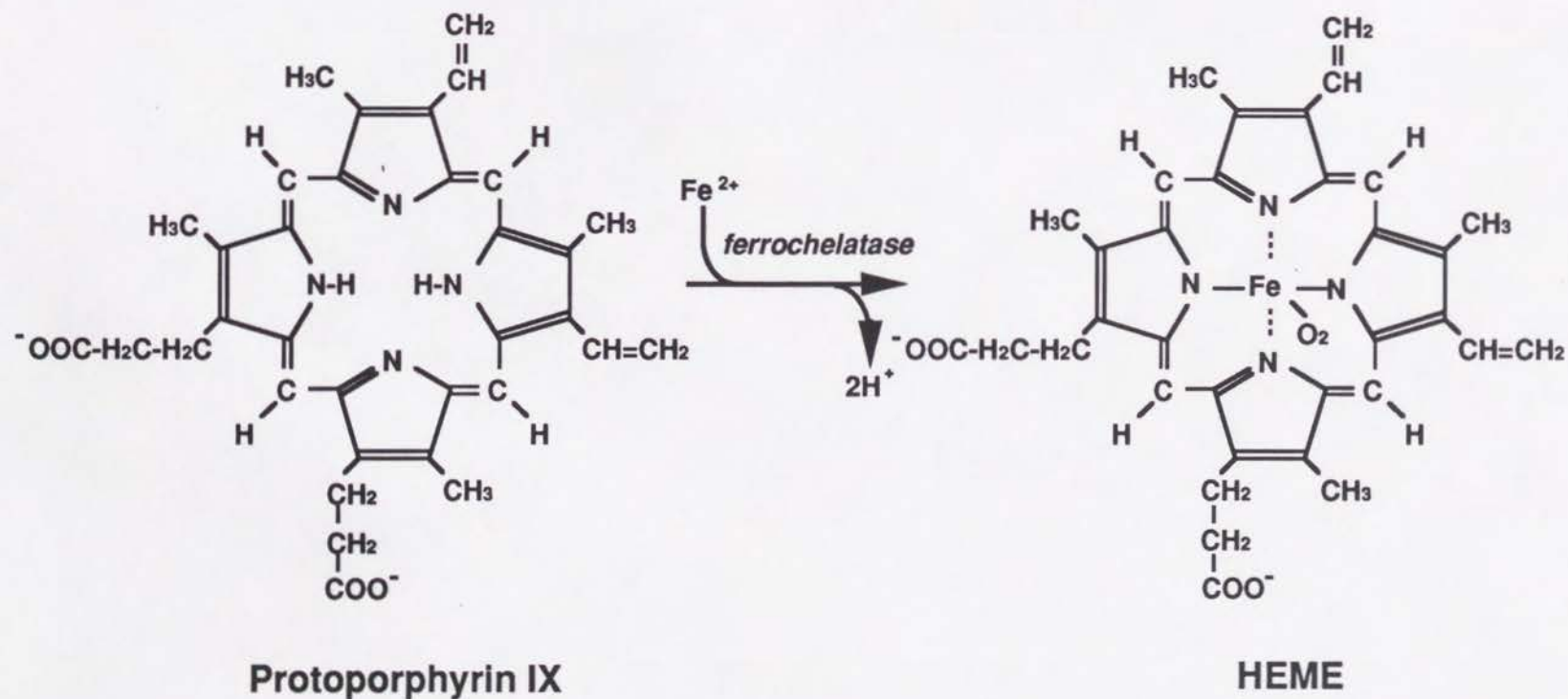


図2 プロトポルフィリンIXおよびヘムの化学構造
 フェロキレターゼの働きによりプロトポルフィリンIXに鉄イオンが挿入されてヘムができる。

本論文では、修士論文に引き続いた可視光感受性株の解析、およびヘム生合成系の最終段階の酵素フェロキレテースに関する研究をまとめた。内容は大きく三部に別れている。第一節では、プロトポルフィリンIXの蓄積に関する大腸菌の可視光感受性株の解析、第二節では、大腸菌フェロキレテースの大量発現系の構築と大量精製および生化学的性質の解析、第三節では、植物のフェロキレテース遺伝子の分離・解析について述べる。

まず第一節では、この大腸菌の可視光感受性株(VS101およびVS200)におけるプロトポルフィリンIXの蓄積を実証した。ヘムの合成系は図1に示した通りであり、*visA*(=*hemH*)遺伝子の欠損した株においては前段階のプロトポルフィリンIXが蓄積していることが予想される。プロトポルフィリンIXは405nm付近の励起光により633nm付近の蛍光を発することが知られている(Kouji *et al.*, 1989; Masuda *et al.*, 1990)。そこで、これらの可視光感受性変異株におけるプロトポルフィリンIXの蓄積を菌体抽出物の蛍光を測定することにより調べた。その結果、*visA*遺伝子の変異による可視光感受性変異株では多量のプロトポルフィリンIXが蓄積していることが証明された(Miyamoto *et al.*, 1992)。また、ファージまたはプラスミドを用いて野生型*visA*遺伝子を導入し、可視光感受性でなくなった株では、プロトポルフィリンIXが蓄積しなくなっていた。さらに、ヘム生合成系のフェロキレテース以前の遺伝子の一つである*hemA*遺伝子に変異が起こり可視光感受性でなくなった株では、プロトポルフィリンIXが蓄積しなくなっていた。これは、*hemA*遺伝子に変異が起こることによって、ヘム生合成系の前の方の段階で合成が止まってしまう、プロトポルフィリンIXが合成されなくなるからである。これらの事実は*visA*遺伝子の欠損とプロトポルフィリンIXの蓄積が直接結び付いていることを示している。また、*visB*遺伝子の変異による可視光感受性株であるVS550株ではプロトポルフィリンIXは蓄積しておらず、大腸菌の可視光感受性はすべてがプロトポルフィリンIXの蓄積によるものではないことも示された。また、ALA、ヘム存在下でのプロトポルフィリンIXの蓄積量の変化を測定し、

少量のヘム存在下におけるヘム生合成系の活性化のモデルを考えた。

第二節では、遺伝子工学的手法を用いて大腸菌のフェロキレテースの大量発現系を構築し、大量精製を行い、さらに精製酵素を用いて大腸菌フェロキレテースの生化学的性質を調べた(Miyamoto *et al.*, accepted)。この研究は、最終的には、酵素の活性中心などを明らかにするため、大腸菌フェロキレテースの立体構造解析を目的としており、研究は蛋白工学研究所(大阪府吹田市)において行った。これまでに、ポルフィリン症の研究から哺乳類のフェロキレテースは精製されていたが、大量には精製されておらず、構造解析についてはいまだ着手されていない。そこで筆者は、発現ベクターpJLA503を用いて大腸菌のフェロキレテースの大量発現系を構築し、発現された酵素をBlue Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィーによって大量に精製して、結晶化の材料とした。その一方、精製酵素の一部を用いて、活性測定、分子量の測定、ペプチドマッピング、等電点・至適pHの測定、CD測定による α -helix・ β -sheet含量の推定などを行った。

第三節では、植物のフェロキレテースの遺伝子を大麦(*Barley*; *Hordeum vulgare* L. cv. cultivar Svalöf's Bonus)とキュウリ子葉(*Cucumber*; *Cucumis sativus* L. cv. Aonagajibai)のcDNAライブラリーより分離した(Miyamoto *et al.*, submitted)。大腸菌VS200($\Delta visA$)株はフェロキレテースの遺伝子 $visA(=hemH)$ を欠失していることから可視光感受性になるとともに成長が著しく悪くなる。これはヘムが合成できないことにより、チトクロムが合成できず、酸素呼吸ができなくなり、解糖系のみによって生きているためと思われる。ここで、筆者は大麦とキュウリ子葉のcDNAライブラリーを大腸菌VS200($\Delta visA$)株に感染させ、成長の良くなる株を分離すれば、そのcDNAにはフェロキレテースの遺伝子がコードされているであろうと考えた。大麦およびキュウリ子葉ともに、そのようなVS200変異株の悪い生育を相補できるcDNAクローンの分離に成功し、その塩基配列を決定した。それぞれのcDNAクローンからORFが見い出され、コンピュータにより予想されるアミノ酸配列のホモロジーを

検索したところ、筆者が以前に報告した大腸菌のフェロキレテース (Miyamoto *et al.*, 1991) とそれぞれアミノ酸レベルで32.0%と31.4%のホモロジーがあり、このcDNAはフェロキレテースをコードしていることが判明した。筆者が報告した大腸菌を含めてフェロキレテースの遺伝子は現在までに6種で報告されている(*E. coli*: Miyamoto *et al.*, 1991; *Bacillus subtilis*: Hansson *et al.*, 1992; *Bradyrhizobium japonicum*: Frustaci, *et al.*, 1992; Yeast: Labbe-Bois, 1990; Mouse: Taketani *et al.*, 1990; Human: Nakahashi *et al.*, 1990b)が、植物のものは含まれておらず、植物のフェロキレテース遺伝子の同定および塩基配列の決定は初めてである。今回の研究による植物をものを含めた8種のフェロキレテースのホモロジーを解析した結果、細菌、動物、植物においてよく保存されている数カ所の領域を見い出した。本論文ではこれらの保存領域と、以前に報告されているシステイン残基およびアルギニン残基の重要性(Dailey, 1984; Dailey *et al.*, 1986a; Dailey & Fleming 1986b)との関連や、大腸菌可視光感受性株におけるフェロキレテース遺伝子の変異位置(Miyamoto *et al.*, 1991)との比較などを通して、フェロキレテースにおける一次構造上の重要な領域についての検討を行った。

材料と方法

1)大腸菌株

本研究にはすべて大腸菌K-12株を用いた。λファージの増殖にはLE392、DNA断片のサブクローニング、プラスミドの調整にはDH5αを使用した。また可視光感受性株はCA274株からVS101、VS200株を作成した。表1に本研究で用いた菌株のマーカ―並びに文献を示す。

表1 本研究で使した大腸菌株

菌株	マーカ―	文献
CA274	HfrC, <i>lacZ</i> ^{-125am} , <i>trp</i> ^{-am} , <i>su</i> ⁻	(Russell <i>et al.</i> , 1970)
LE392	F ⁻ , <i>hsdR</i> 514(<i>r</i> _k , <i>m</i> ⁻ <i>b</i>), <i>supE</i> 44, <i>supF</i> 58, <i>lacY</i> 1 or Δ(<i>lacI</i> ZY)6, <i>galk</i> 2, <i>galT</i> 22, <i>metB</i> 1, <i>trpR</i> 55, λ ⁻ , <i>mcrA</i> ⁻ , <i>mcrB</i> ⁺	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
DH5α	<i>supE</i> 44, Δ <i>lacU</i> 169(φ80 <i>lacZ</i> ΔM15), <i>hsdR</i> 17, <i>recA</i> 1, <i>endA</i> 1, <i>gyrA</i> 96, <i>thi</i> -1, <i>relA</i> 1	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
VS101	<i>visA</i> ⁻¹	(Miyamoto <i>et al.</i> , 1991)
VS200	Δ <i>visA</i>	(Nakahigashi <i>et al.</i> , 1991)
VS215	Δ <i>visA</i> , <i>hemA</i> ⁻	(Nakahigashi <i>et al.</i> , 1991)
VS281	Δ <i>visA</i> , <i>hem</i> ^P (ヘム透過性)	(Nakahigashi <i>et al.</i> , 1991)
VS550	<i>visB</i> ₁₀₃	(Nakahigashi <i>et al.</i> , 1992)
VS600	Δ <i>visC</i> : Km ^r	(Nakahigashi <i>et al.</i> , 1992)
FC103	DH5α(pFC3)	本研究

*VSXXXはすべてCA274から作成した株である。

2) ファージとプラスミド

本研究で用いたファージおよびプラスミドの種類および文献を表2に示す。

表2 本研究で使したファージおよびプラスミド

名称	マーカーおよび特徴	ベクター	文献
pUC118	Amp ^r		(Vieira & Messing, 1987)
pHSG399	Cm ^r		(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
pJLA503	Amp ^r 、P _R ・P _L プロモーター		(Schauder <i>et al.</i> , 1987)
λgt・λC	EcoRIでクローニング		(Thomas <i>et al.</i> , 1974)
λgt11	EcoRIでクローニング		(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
#17	<i>visA</i> ⁺	λgt・λC	(Miyamoto <i>et al.</i> , 1991)
pVRL1	<i>visA</i> ⁺	pUC118	(Miyamoto <i>et al.</i> , 1991)
pFC3	<i>visA</i> 発現系	pJLA503	本研究
BA1	大麦フェロキレテース	λgt11	本研究
pBA10	大麦フェロキレテース	pUC118	本研究
pBA11	大麦フェロキレテース	pUC118	本研究
CU3	キュウリフェロキレテース	λgt11	本研究
pCU34	キュウリフェロキレテース	pUC118	本研究
pCU98	キュウリフェロキレテース	pHSG399	本研究

3) 試薬等

本研究で使用した試薬等は次の通りである。

プロトポルフィリンIX (Aldrich Chemical Co., Ltd. ; Milwaukee, WI, USA)

ヘム、DTT (Sigma Co., Ltd. ; St. Louis, MO, USA)

Blue Sepharose CL-6B、Sephacryl S-300、low-molecular-weight marker kit、gel-filtration calibration kit、Ampholine (pH 3-9)

(Pharmacia LKB Biotechnology Inc. ; Uppsala, Sweden)

酵素、DNA操作用試薬等[宝酒造(株); 京都または東洋紡(株); 大阪]

その他の試薬 [和光純薬工業(株); 大阪またはナカライテスク(株); 京都]

4) 培地と培養条件

使用した培地は、通常の完全培地としてはLB培地または λ 培地を、ファージの液体培地での調整にはNZamine培地を使用した。ただし、プラスミドの調整用の培地はGlucoseを加えていない。抗生物質の濃度はアンピシリンは50 μ g/mlで、クロラムフェニコールは25 μ g/mlで加えた。

プレートへの光照射は、40W蛍光灯(日立、サンラインFL40SSD/37-G)2本の直下約15cm(約7500ルクス)にプレートを置くことによって行った。液体培養への照射はHoya-Schott(株)の"Cold Light"照射装置(HLS2151)を使用した。暗所での対照試料はアルミホイルで包んで遮光して、同じ場所で培養した。他に特筆しない限り、光感受性株の培養は、37℃、好氣的条件、暗所で、他の株については明所で行った。

5) 蛍光測定

プロトポルフィリンIXは405nm付近の励起光により633nm付近の蛍光を発することが知られている(Kouji *et al.*, 1989; Masuda *et al.*, 1990)。そこで、菌体抽出物の蛍光を測定することによりプロトポルフィリンIXの蓄積を調べた。まず、測定したい大腸菌株をLB培地中で培養する。OD_{600nm}を測定し菌数を推定し同数の菌数をサンプルチューブに取り、遠心して培地を取り除いた後、3mlの抽出溶液(90%, アセトン; 10%, 0.1N NH₄OH)中に懸濁した。よく攪拌した後、3000rpmで遠心し浮遊物を分離し、測定サンプルとした。測定には、蛍光分光光度計[FD-770、日本光学(株)、東京]を用い、励起スペクトルを405nmに設定し、600nm付近の蛍光スペクトルを測定した。濃度のわかっているプロトポルフィリンIX溶液を用意し、蛍光強度とプロトポルフィリンIX濃度の検量線を作成し、測定サンプル中のプロトポルフィリンIX濃度を決定した。

6)大腸菌フェロキレテース大量発現系の構築

プラスミドpJLA503に *visA* 遺伝子を挿入し大量発現系を構築した。まず、*visA* 遺伝子を挟むようにプライマーを合成し、PCR法で増幅した。

合成プライマーの配列は

プライマー 1 ; 5'-GGCATATGCGTCAGACTAAAACCGGTATCC-3'

プライマー 2 ; 5'-GGGTCGACGGCGCTCAGTTCTTTACGGC-3'

である。プライマー 1 には *NdeI* サイト、プライマー 2 には *SalI* サイトを含み *NdeI* サイト中の ATG からフェロキレテースの遺伝子が始まるようになっている。増幅した *visA* 遺伝子を発現ベクターpJLA503に挿入し、それをpFC3と命名した。発現系構築の過程を図3に示す。

7)大腸菌フェロキレテースの大量発現

pJLA503は λ ファージの P_R 、 P_L プロモーターを含み CI^{857} リプレッサーを持つため、培養温度を32°Cから42°Cに上げることによって発現がコントロールできる。pFC3によって大腸菌DH5 α を形質転換しこれをFC103とした。FC103を50mlのLB-Amp培地で32°Cで培養し前培養とした。この前培養を培養装置に入れた4リットルのLB-Amp培地に植え継ぎ、32°Cにて培養を開始した。550nmの吸光度によって菌数を測定し、OD_{550nm}が1.0に達したところで培養温度を42°Cに上げプラスミドからの発現を誘導した。温度を上げた後、約4時間後に培養を停止し、遠心して集菌し、-20°Cで保存した。この菌体でのフェロキレテースの発現をSDS-PAGEで解析した。

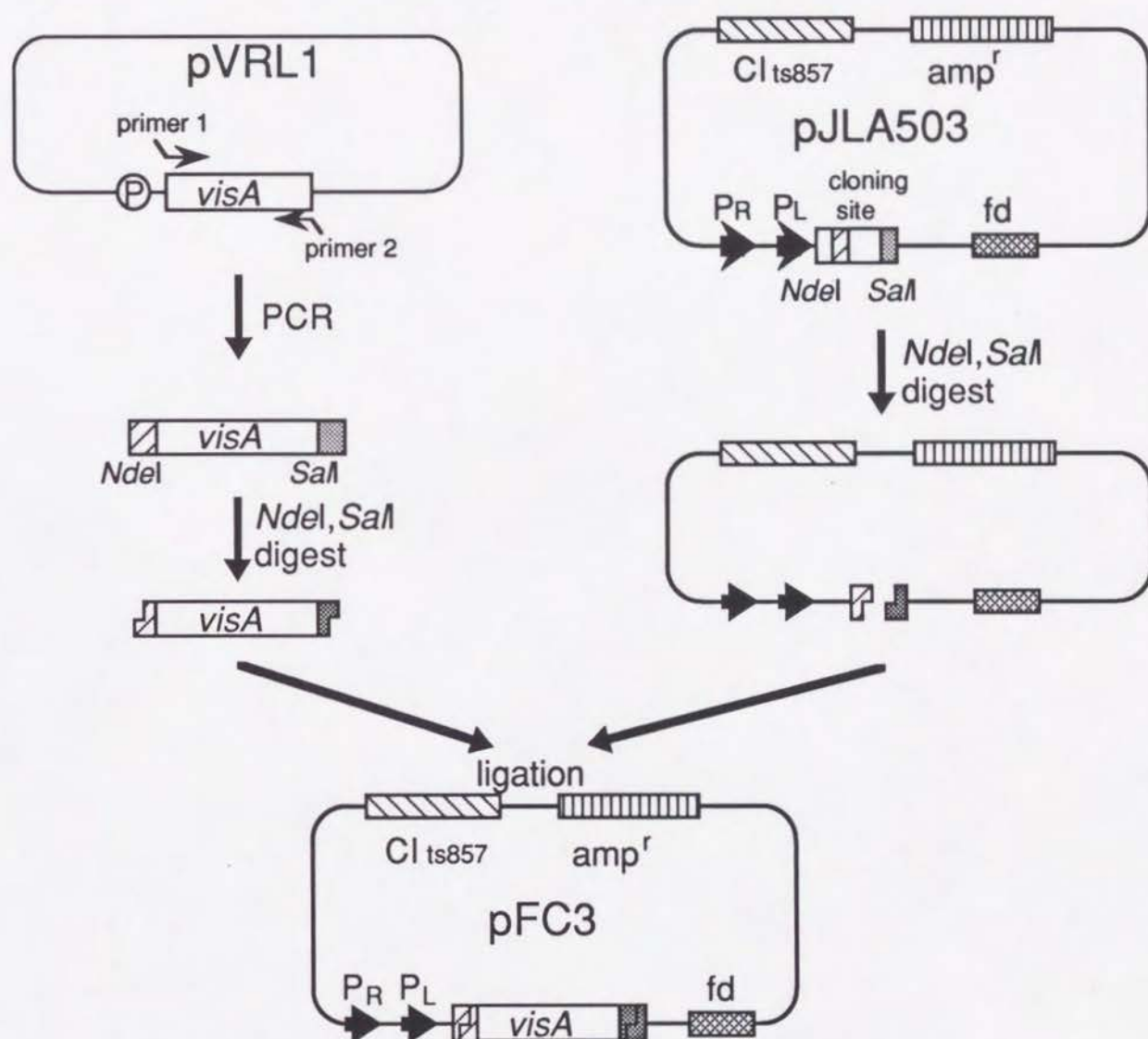


図3 大腸菌フェロキレターズの大量発現系構築の過程

PCR法で増幅した*visA*遺伝子を発現ベクターpJLA503に挿入した。pUC118に*visA*遺伝子を含む3.5kBEcoRI断片を挿入したpVRL1を鋳型にし、*visA*遺伝子の両側に*NdeI*、*SalI*サイトを持つプライマー（本文参照）で*visA*遺伝子を増幅した。それを、*NdeI*、*SalI*で切断したpJLA503に挿入した。pJLA503の*NdeI*サイトにはATGを含んでおり、このATGが開始コドンになるようにプライマーを合成した。このベクターはλファージのPR、PLプロモーターを持っており、*Cl_{ts857}*遺伝子を持っているため、培養温度を32℃から42℃に上げることによって発現をコントロールできる。

8)大腸菌フェロキレテースの大量精製

a)リゾチームによる溶菌とBrij35による可溶化

−20℃で保存しておいた大量発現された大腸菌(FC103)の菌体を、30mlの40mM Tris-HCl (pH8.0)、25% サッカロース、1mM DTT、2.5mM EDTA、1% Brij35溶液に懸濁した。さらに、菌体を破壊するためにリゾチームを0.5mg/mlになるように加えた。その後、10mM MgCl₂、0.2M NH₄Clを加え、核酸の分解のため100μg/ml RNaseA、20μg/ml DNaseIを加え、37℃で30分処理した。これらの操作で大腸菌の菌体を破壊し、フェロキレテースを可溶化した。この懸濁液を12000gで15分遠心したところ、沈殿と上清に分かれた。SDS-PAGEで解析したところ、フェロキレテースは上清に見い出されたので、上清を次の硫安分画に用いた。

b)硫安分画

次に、可溶化されたフェロキレテースを硫酸アンモニウムによる塩析によって分画した。まず、20%飽和の硫安存在下では、ほとんど沈殿は生じなかった。次に、40%飽和にすると、沈殿が生じ12000gで遠心した。すると、この沈殿は沈まずに浮遊物となった。この浮遊物と上清をSDS-PAGEによって解析するとフェロキレテースは浮遊物中に存在した。よって、この浮遊物を回収し、TGDEバッファー[25mM Tris-HCl (pH8), 20% glycerol, 1mM DTT, 2.5mM EDTA] に溶かし、次の段階に用いた。

c)Blue-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィーによる精製

硫安分画で得られたサンプルをBlue Sepharose CL-6B(2.2cm×20cm)カラム

を用いて精製した。上記TGDEバッファーで平行化したカラムにサンプルを40ml/hでロードし、同バッファー100mlを用い60ml/hで洗った。次に、1M KClを加えたTGDEバッファー1リットルを用い60ml/hで十分に洗った。さらに、1.5M KClと1%コール酸ナトリウムを加えたTGDEバッファー200mlを用い40ml/hでフェロキレテースを溶出した。10mlずつ分取しSDS-PAGEでフェロキレテースの含まれる分画を集めた。当初は、精製の段階でかなり分解産物が見られたが、バッファー中にEDTAを加えることでかなり防げるようになった。

9) フェロキレテース活性の測定

フェロキレテース活性の測定方法は、様々な方法が報告されているが、本論文では、鉄の取り込みを測る方法としてピリジンヘモクローム法(Taketani & Tokunaga, 1981)を用いた。この方法は、基質と酵素を入れて反応させた後、生じたヘムをアルカリ性でピリジンヘモクロームに変化させ、さらに還元型のピリジンヘモクロームの半分を、亜ニチオン酸ナトリウムによって酸化型にし、557nmと540nmの吸光度の差を測定するものである。反応溶液[0.1 mM プロトポルフィリンIX、1 mM クエン酸鉄、5 mM DTT、50 mM Tris-HCl緩衝液(pH 8.0)、酵素溶液]0.5mlを小試験管に入れ窒素置換によって嫌氣的条件にし、37℃で30分反応させた。0.25mlの50mMヨードアセトアミドを加えて反応を停止させ、0.125mlの1N NaOHと0.125mlのピリジンを加えた。反応溶液を2つに分け、一方に亜ニチオン酸ナトリウムを加えて酸化した。557nmと540nmで酸化型と還元型差スペクトルを測った。測定には分光光度計[UV-160A; 島津(株)]を用いた。プロトヘム生合成量の計算には $\Delta\epsilon\text{mM}=\epsilon^{557}\text{mM}-\epsilon^{540}\text{mM}=20.7$ を用いた(Porra & Jones, 1963a; Porra & Jones, 1963b)。

10) 蛋白質濃度の測定

蛋白質の濃度は、Bradfordの方法(Bradford, 1976)を用い、BSA(bovine serum albumin)を基準にして決定した。アッセイにはBio-Rad社のキットを用いた。また、紫外線の吸収からも蛋白質濃度を測定した。0.1%の蛋白質濃度でA₂₈₀の値は0.5を用いた。

11) Sephacryl S-300カラムクロマトグラフィーによる分子量の測定

精製したフェロキレテースの実際の分子量を知るためにSephacryl S-300カラム(1.5cm×90cm)によってゲルろ過を行った。Blue-Sepharose CL-6Bカラムからの溶出と同じバッファー(TGDE + 1.5M KCl + 1% コール酸ナトリウム)を用い6ml/hで溶出を行った。分子量マーカーにはblue dextran、bovine serum albumin (67 kD)、ovalbumin (43 kD)、chymotrypsinogen A (25 kD)、RNaseA (13.7 kD)を用いた。

12) 高速液体クロマトグラフィーによるペプチドマッピングとプロテインシーケンシング

精製酵素をリジンエンドプロテアーゼ(LEP)[生化学工業(株)、東京]で37℃、pH9、30分の条件(Kanaya & Itaya, 1992)で分解した。この酵素はリジンのC末側で切断するので図18の様に分解される。このペプチドをAquapore RP-300カラム(4.6mm×250mm)を用いて逆相HPLCで主なピークを分取し(Kanaya & Uchida, 1986)、アミノ酸配列の解析を行った。アミノ酸シーケンスにはアミノ酸シーケンサー(477A型、Applied Biosystems)にON-LINE HPLC(120A型、Applied Biosystems)を接続して用いた。

13)等電点電気泳動

等電点電気泳動にはAmpholine (pH 3-9) (Pharmacia)をサッカロース溶液中でpH勾配を作らせて、サンプルを勾配の真ん中付近にロードし700Vで一晩電気泳動した(Vesterberg, 1971)。泳動後、泳動装置から5mlずつ分取し、pHとOD280nmを測定し酵素が存在する分画のpHを決定した。

14)円二色性変換測定による蛋白質の構造予測

精製酵素標品を用いて円二色性変換(circular dichroism; CD)測定を行った。測定にはJ-600型CD測定装置[日本光学(株)、東京]を用いた。測定用セルは2mm厚のものを使用した。サンプルは、精製酵素をTGDEバッファで希釈して使用した。希釈した蛋白質の濃度は0.22 mg/mlであった。CDのデータから Provencherらの計算式(Provencher & Glöckner, 1981)を用い大型コンピュータで α -helixと β -sheetの含量を計算した。

15) 大麦およびキュウリ子葉のcDNAライブラリーからの フェロキレテース遺伝子を含むクローンの分離

大麦(Barley; *Hordeum vulgare* L. cv. cultivar Svalöf's Bonus)とキュウリ子葉(Cucumber; *Cucumis sativus* L. cv. Aonagajibai)のcDNAライブラリーは植物学教室辻研究室の田中亮一氏、寺本陽彦氏、増田建氏が作成したものを分与していただき、使用した。 λ ファージ(λ gt11)で作成したcDNAライブラリーを一回増殖させた後、大腸菌VS200株に感染し、 λ プレートに植え暗所で3日間培養した。VS200株はヘムを欠損しているため良く成長できないがcDNAライブラリーを感染させると良く成長する株コロニーが数個出現した。このコロニーを増やして高温(42°C)による誘発によって溶原化していたファージを分離し、そのDNAを解析した。

16) cDNAのクローニングとDNAシーケンシング

大麦・キュウリ子葉ともに、誘発したファージのDNAはEcoRIで切断すると、すべて約1.8kbの挿入断片を持っていた。そこで、大麦・キュウリ子葉それぞれ各1クローンを選び挿入DNA断片をEcoRIで切断し、LMPアガロースで精製した。このEcoRI断片をプラスミドpUC118に挿入した。大麦のcDNAを両方向にpUC118に挿入したものをそれぞれpBA10、pBA11、キュウリ子葉のcDNAをpUC118に挿入したものをpCU34とした。ただし、キュウリ子葉の場合、遺伝子の向きとベクター上のlacZ遺伝子の向きが同方向の場合にはプラスミドのコピー数が少なかったため、逆向きのマルチクローニングサイトを持つpHSG399に、EcoRIに挿入しpCU98としている。

cDNAをクローニングしたプラスミドをキロシーケンス用デレーションキット(宝酒造、京都)を用いて欠失変異体を作成した(Yanish-Perron *et al.*, 1985)。その欠失変異体をSequenase Ver.2シーケンスキット(USB, Cleaveland

Ohio)を用いて塩基配列を決定した。

17)塩基配列およびアミノ酸配列のコンピュータによる解析

DNA塩基配列およびその遺伝子産物のアミノ酸配列の解析には、解析プログラム:GENETIX(Ver9.01)[ソフトウェア開発(株)、東京]によった。またホモロジーの検索およびアミノ酸多重アライメントは、国立遺伝学研究所および理化学研究所のデータベースとネットワークによって接続して解析を行った。

18) その他の方法

大腸菌、ファージ、プラスミドの取扱法、DNAの精製、酵素の使用法、クローニング、SDS-PAGEなどの基本的な実験操作は、文献(*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al., 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., 1987)に従った。

結 果

第一節 大腸菌可視光感受性株におけるプロトポルフィリンIXの蓄積

プロトポルフィリンIXは405nm付近の励起光により633nm付近の蛍光を発することが知られている(Kouji *et al.*, 1989; Masuda *et al.*, 1990)。そこで、可視光感受性変異株におけるプロトポルフィリンIXの蓄積を菌体抽出物の蛍光を測定することにより調べた(Miyamoto *et al.*, 1992)。まず、可視光感受性株のVS101株と野生型のCA274株でのプロトポルフィリンIXの蓄積を調べた。VS101株の抽出物ではCA274株の抽出物では見られなかったピークが確認された(図4)。このピークは励起スペクトル405nmの時に633nmの蛍光スペクトルが観察され、このピークはプロトポルフィリンIXによるものである。この結果、*visA*遺伝子の変異による可視光感受性変異株では明らかにプロトポルフィリンIXが蓄積していることが証明された。

次に、VS101株とVS200株での可視光感受性とプロトポルフィリンIXの蓄積量の関係を調べた(図5)。VS200株はVS101株よりも可視光感受性が強く(図5A)、プロトポルフィリンIXも多く蓄積している(図5B)。ただし、VS200株はVS101株より約10倍可視光感受性は強いが、プロトポルフィリンIXの蓄積は約2倍多いだけである。

次に*visA(hemH)*遺伝子を光感受性株に導入することによってプロトポルフィリンIXの蓄積に変化が見られるかを調べた(図6)。まず、ファージにより*visA*遺伝子をVS101に導入した。*visA*遺伝子を持ったファージ(#17)をVS101に感染させると光抵抗性になる。この溶原菌でプロトポルフィリンIXの蓄積を測定したところ、プロトポルフィリンIXの蓄積は見られなかった(図6A)。次に、プラスミドにより*visA*遺伝子をVS101に導入した。*visA*遺伝子を持ったプラスミド(pVRL1)をVS101に形質転換すると光抵抗性になる菌がでてくる。この菌においても、プロトポルフィリンIXは蓄積していなかった(図6B)。この実験よりプロトポルフィリンIXは*visA*遺伝子の欠失により蓄積すること

がはっきりした。また、VS200に関して同様の実験を行ったが、全く同じ結果が得られた。

さらに、このプロトポルフィリンIXの蓄積とヘム生合成系との関係を調べるため、*visA(hemH)・hemA*の二重変異体(R515)での光感受性とプロトポルフィリンIXの蓄積を調べた(図7)。この二重変異体(R515)は、可視光感受性変異株から光感受性を復帰した変異株として分離したものである(図7A)。これは*hemA*遺伝子の変異によってプロトポルフィリンIXよりも前の段階で合成が止まり、プロトポルフィリンIXは蓄積しないからであろうと考えられる。そこで実際にR515株でのプロトポルフィリンIXの蓄積を調べたところ、予想通りプロトポルフィリンIXは蓄積していなかった(図7B)。

次に、フェロキレテースに欠損が起こっているとき、前段階の物質であるALAを過剰に加えてもヘム生合成系は動いているのか、また、フェロキレテースの産物であるヘムを加えると、ヘム生合成系は抑制されるのかを知る目的で、培地中にALA・ヘムが存在するときにプロトポルフィリンIXの蓄積に変化が見られるかを調べた(表3・表4)。VS101株においてALA・ヘムを培地中に加えて一晩培養しプロトポルフィリンIX量を調べた。ALA・ヘムどちらを加えた場合においてもプロトポルフィリンIXの蓄積量が増加した。ALAはプロトポルフィリンIXの前駆体であるのでプロトポルフィリンIXの蓄積量が増加するのは予想通りである。ヘムを加えたときは、ヘム生合成系が抑制されて、プロトポルフィリンIXの蓄積量が減少することを予想したが、結果は逆に増加していた。

VS101株はヘムを細胞内に透過しないので、VS200株より分離したヘム透過性変異株(VS281)を用いて同様の実験を行なった(表4)。結果は、VS101の場合と同様ヘム存在下でプロトポルフィリンIXの蓄積量が増加しており、約10 μ g/mlのヘム存在下では約3.6～4倍のプロトポルフィリンIXが蓄積していた。

さらに、可視光感受性株とプロトポルフィリンIXの蓄積の関係を明らかに

するため、*visA*とは別の、ユビキノン合成系の遺伝子である、*visB*遺伝子の変異によって可視光感受性になったVS550株と、それに相同的な遺伝子*visC*に欠失変異株であるVS600株(Nakahigashi *et al.*, 1992)での光感受性とプロトポルフィリンIXの蓄積を調べた(図8)。まず、VS550とVS600での可視光感受性を示す(図8A)。VS101株とVS200株は蛍光灯下約15cmでは全く生えてこない。VS550は多少光感受性が弱く蛍光灯下約15cmでは少し生えてくる。VS600は可視光感受性を示さない。ここで、VS550とVS600でのプロトポルフィリンIXの蓄積を調べたところ両株ともにプロトポルフィリンIXの蓄積は見られなかった。このことからVS550の可視光感受性はプロトポルフィリンIXの蓄積によるのではない別の機構によるものと言える。このVS550株はユビキノン合成系の遺伝子の欠損株であることが確認されている(Nakahigashi *et al.*, 1992)。

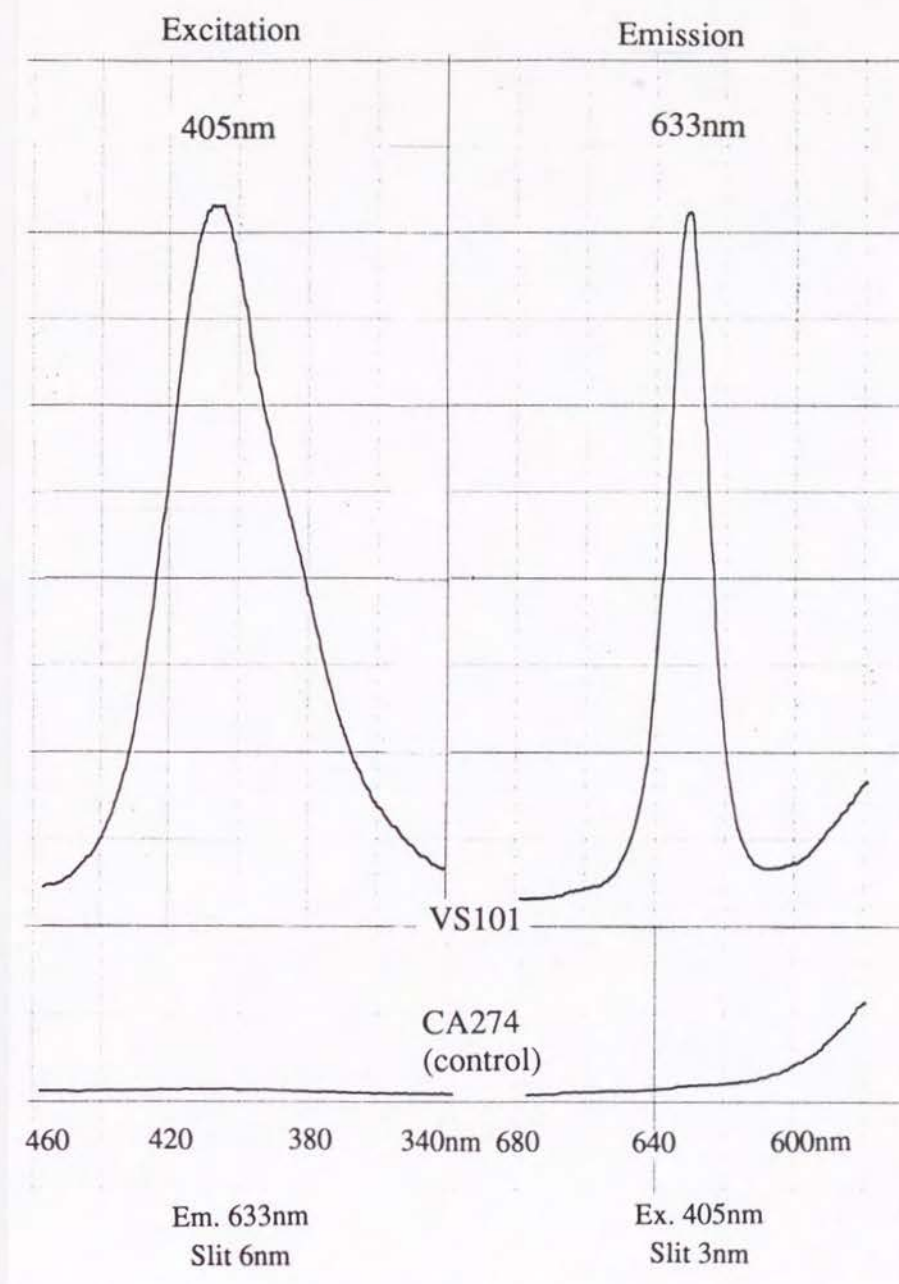
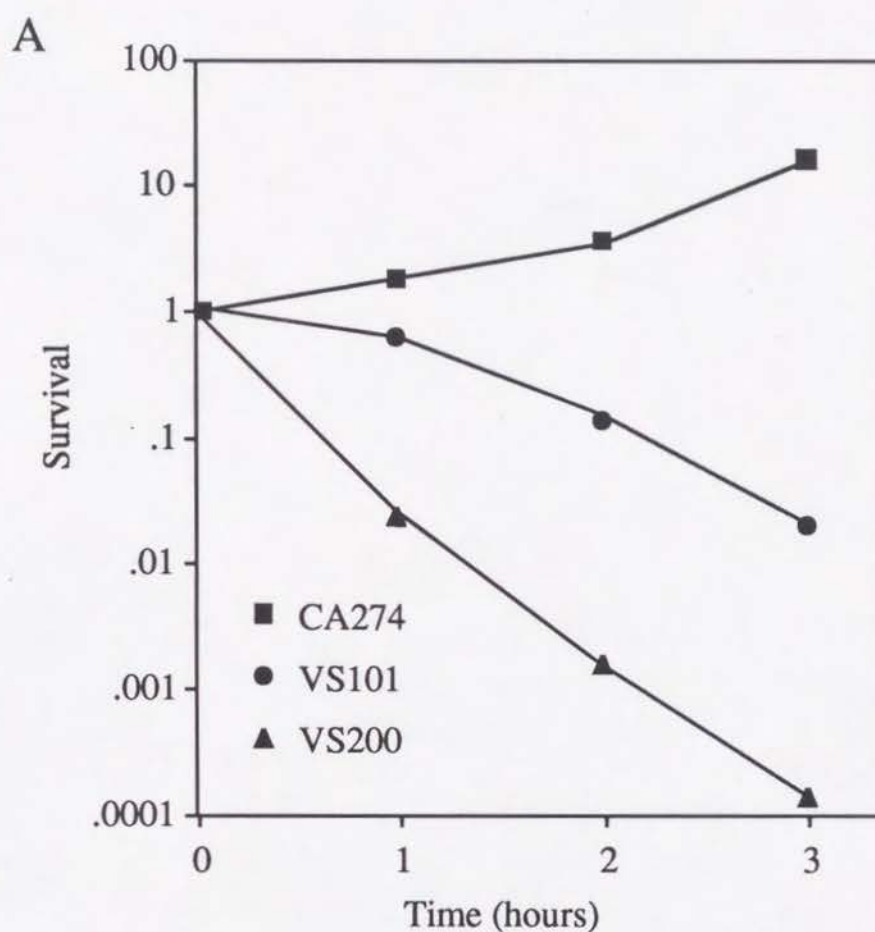


図4 蛍光測定による大腸菌VS101におけるプロトポルフィリンIXの蓄積
大腸菌株VS101株とCA274株(control)をLB培地中で培養し、遠心して培地を取り除いた後、3mlの抽出溶液(90%, アセトン; 10%, 0.1N NH_4OH)中に懸濁した。よく攪拌した後、3000rpmで遠心し沈殿を分離し、測定サンプルとした。まず、励起スペクトル(excitation)の値を蛍光スペクトル(emmission)を約630nmにして測定し、励起スペクトルは、405nmで測定することの決定した。さらに、励起スペクトルを405nmに設定し、600nm付近の蛍光スペクトルを測定し、ピークの大きさを調べた。後の実験では励起スペクトルは405nmに固定して、蛍光スペクトルのピークの有無を調べている。

VS101株では蛍光スペクトル632nm付近にピークが見られ、明らかにプロトポルフィリンIXが蓄積しているが、CA274株ではこのピークは全く見られない。



B

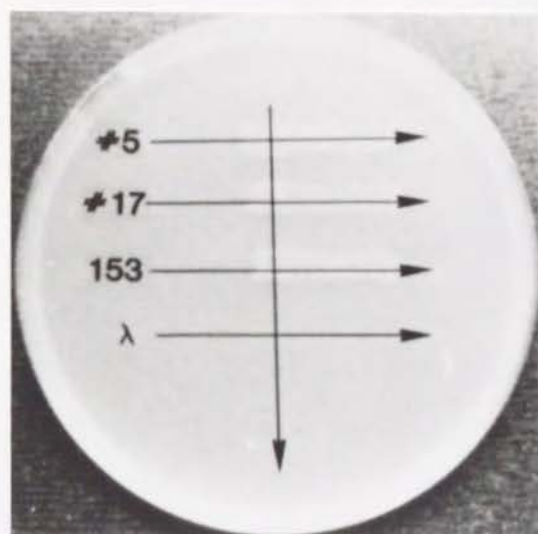
Sample	OD600	Proto IX (M/ml)	$\frac{\text{Proto IX}}{\text{OD600}} \times 10^{-10}$
VS101	1.52	1.08×10^{-9}	7.15
VS200	0.25	3.55×10^{-10}	13.68

図5 VS101株とVS200($\Delta visA$)株における
可視光感受性とプロトポルフィリンIX蓄積量の関係

A. VS101株とVS200株の可視光感受性の違い
VS200株はVS101株より可視光感受性になっている。

B. VS101株とVS200株では細胞数あたりのプロトポルフィリンIX蓄積量は約2倍となっている。

A.



VS101+λ3.5 +

蛍光測定

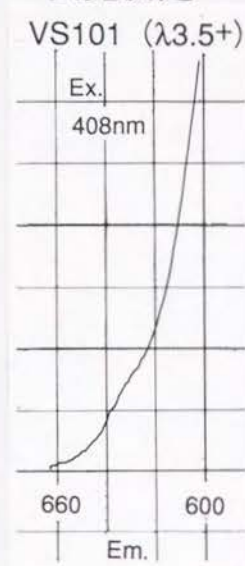
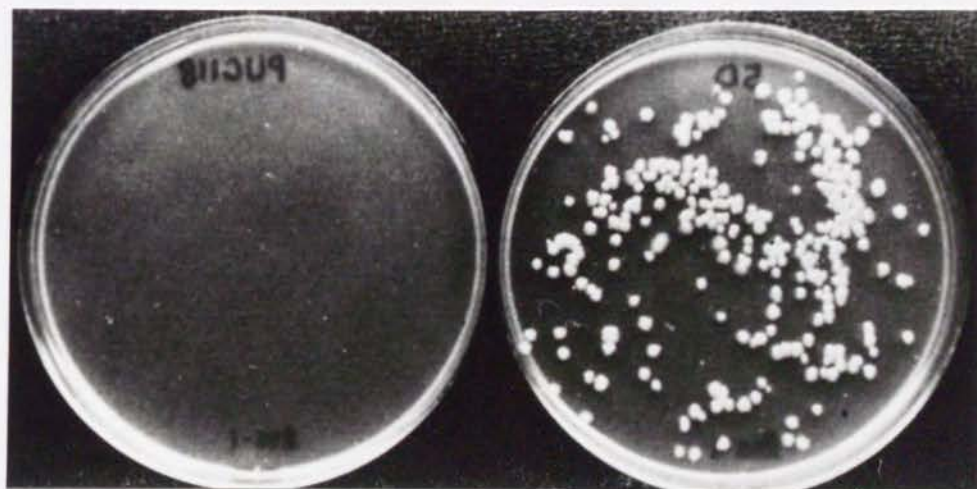


図6A クロスストリークによる相補性とプロトポルフィリンIXの蓄積
VS101株にλファージによってvisA遺伝子を導入すると、可視光感受性でなくなり、プロトポルフィリンIXも蓄積していない。

B.



VS101(pUC118)

VS101(pVRL1)

蛍光測定

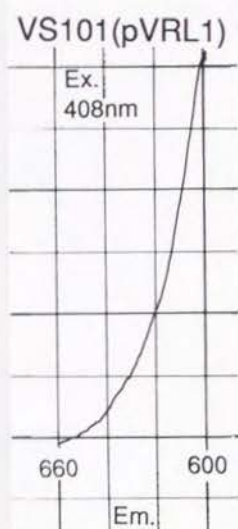
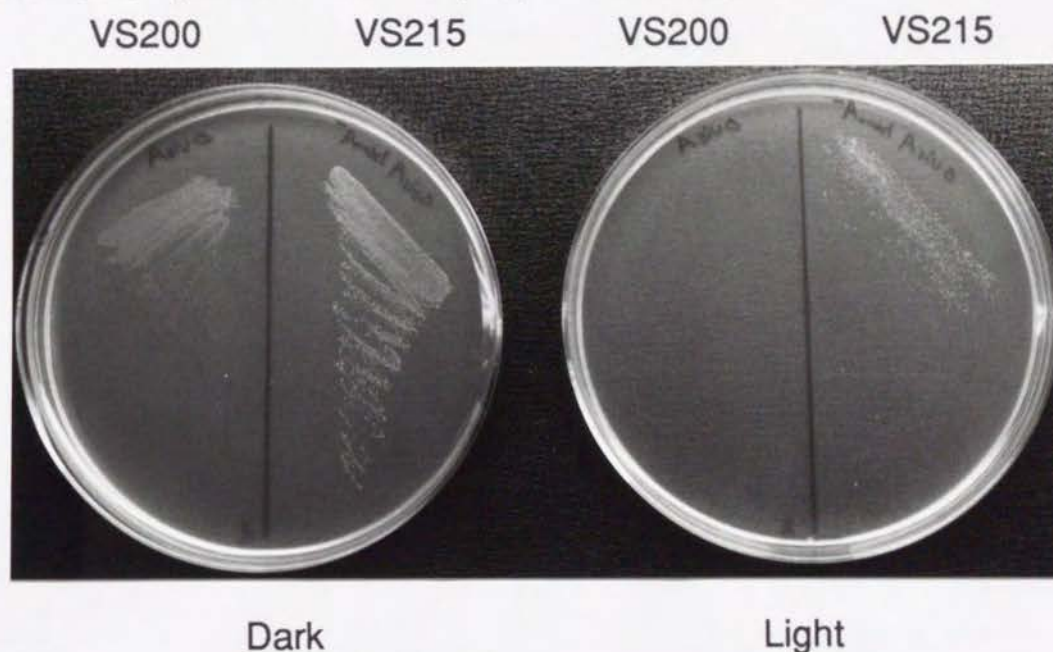


図6B プラスミドによる相補性とプロトポルフィリンIXに蓄積
VS101株にプラスミド(pVRL1)によってvisA遺伝子を導入しても可視光感受性が回復し、その株ではプロトポルフィリンIXは蓄積していなかった。

A. VS215 ($\Delta visA + hemA^-$) 株の可視光感受性



B.

蛍光測定

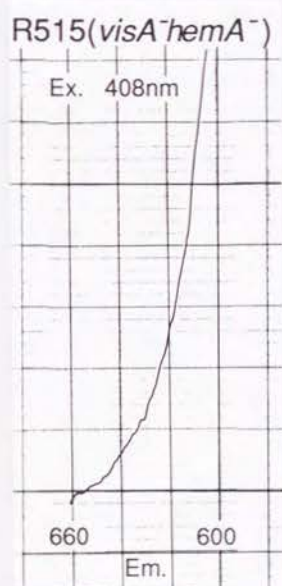


図7 VS215($\Delta visA + hemA^-$)株(=R515株)での可視光感受性とプロトポルフィリンIXの蓄積

VS200株から作成したVS281株は $hemA$ 遺伝子の変異のためヘム合成系がALAの前で止まってしまい(図1参照)、プロトポルフィリンIXは作られていないと予想される。A、この株は可視光に抵抗性である。B、実際に、この株ではプロトポルフィリンIXは蓄積していない。

ヘム、ALA の添加量	菌数 (コ)	Proto IX量 (mol/ml)	1菌あたり Proto IX量	対VS101比
VS101(control)	1.5×10^9	1.5×10^{-9}	1.8×10^{-18}	—
ヘム 10 μ M	7.9×10^8	2.8×10^{-9}	3.5×10^{-17}	3.5
20 μ M	5.3×10^8	4.0×10^{-9}	1.5×10^{-18}	15.0
50 μ M	1.9×10^9	3.9×10^{-9}	2.1×10^{-18}	2.1
100 μ M	5.7×10^8	1.5×10^{-9}	2.6×10^{-18}	2.6
200 μ M	3.3×10^9	3.8×10^{-9}	1.2×10^{-18}	1.2
ALA 10 μ M	8.6×10^8	5.5×10^{-9}	6.4×10^{-18}	6.4
50 μ M	1.6×10^9	1.1×10^{-8}	6.9×10^{-18}	6.9
100 μ M	9.3×10^8	1.2×10^{-8}	1.3×10^{-17}	13.0
500 μ M	1.7×10^9	8.5×10^{-9}	5.0×10^{-18}	5.0

表3 ヘム、ALAが存在下でのプロトポルフィリンIXの蓄積

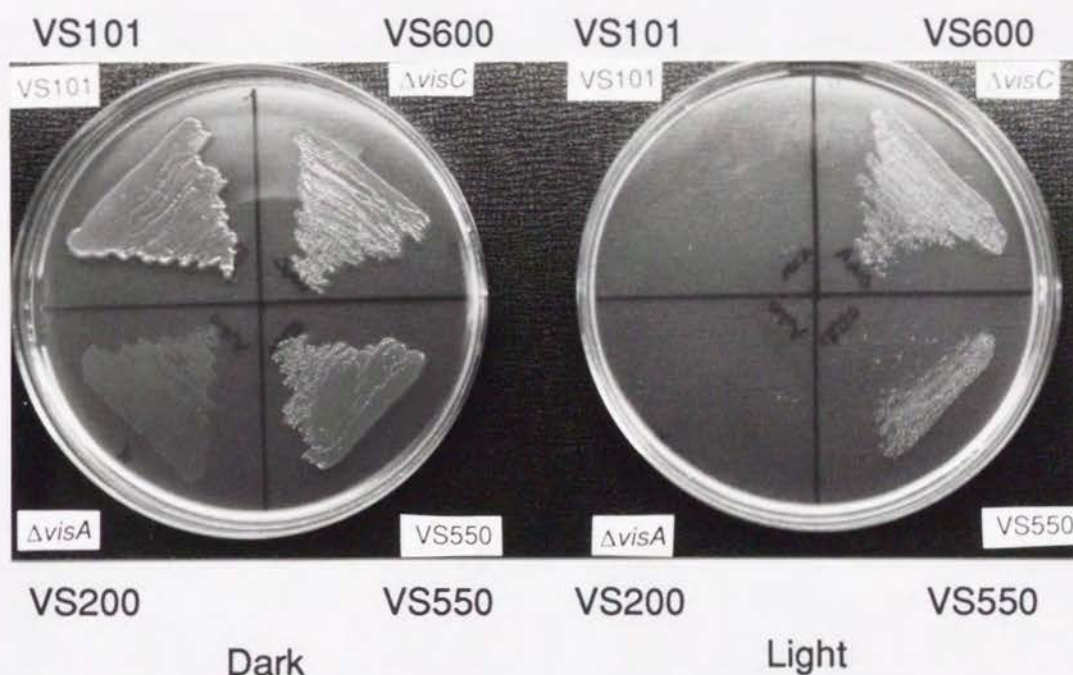
VS101株において、ヘム、ALAを培地中に加えて一晚培養しプロトポルフィリンIX量を調べた。ヘム、ALAどちらを加えた場合においてもプロトポルフィリンIXの蓄積量が増加した。

Sample (VS281)	ヘム (10 μ M)	OD ₆₀₀	Proto IX (mol/ml)	$\frac{\text{Proto IX}}{\text{OD}_{600}} \times 10^{-9}$	$\frac{\text{ヘム+}}{\text{ヘム-}}$
1回目	-	0.398	1.2×10^{-9}	3.02	3.65
	+	1.632	1.8×10^{-8}	11.03	
2回目	-	0.385	1.1×10^{-9}	2.86	4.07
	+	1.976	2.3×10^{-8}	11.64	

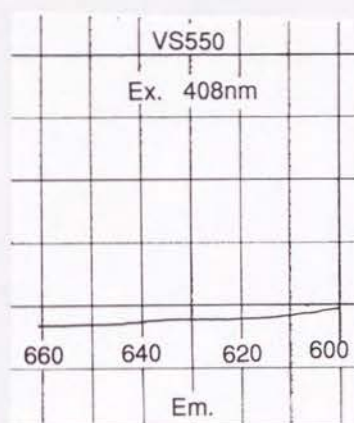
表4 ヘム透過性変異株でのプロトポルフィリンIXの蓄積

VS101株はを細胞内に透過しないことが予想されるので、VS200株より分離したヘム透過性変異株(VS281)を用いて同様のことを行なった。結果は、VS101の場合と同様ヘム存在下ではプロトポルフィリンIXの蓄積量が増加していた。

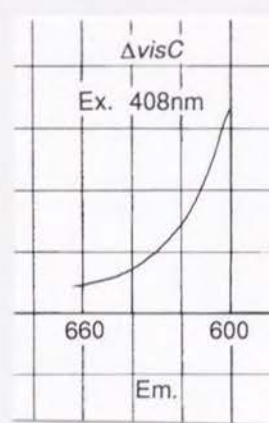
A.



B. 蛍光測定



VS550



VS600

図8 VS550株とVS600株でのプロトポルフィリンIXの蓄積

A. VS101株、VS200株、VS550株、VS600株での光感受性を示した。

VS550株は *visA(hemH)* とは別の遺伝子 (*visB*) の変異による光感受性株であり、VS600株は *visB* 遺伝子のすぐ下流に存在する *visB* とホモロジーの高い遺伝子 (*visC*) の欠失変異株である。VS101株とVS200株は蛍光灯下約15cmでは全く生えてこない。VS550株は多少光感受性が弱く蛍光灯下約15cmでは少し生えてくる。VS600株は光感受性を示さない。

B. VS550株とVS600株でのプロトポルフィリンIXの蓄積は見られなかった

第二節 大腸菌フェロキレテースの精製

大腸菌フェロキレテースのX線立体構造解析を目的として、大腸菌のフェロキレテースの大量発現系を構築し、発現した酵素を大量に精製した。一方、この精製酵素標品を用いて大腸菌フェロキレテースの様々な生化学的性質を調べた。

1) 大量発現系のためのプラスミドの構築と大量発現

まず、大量フェロキレテースの大量発現系の構築を行った。*visA*遺伝子を挟むようにプライマーを合成し、PCR法で増幅した。このプライマーには片方には*NdeI*サイトもう片方には*SalI*サイトを含み*NdeI*サイト中のATGからフェロキレテースの遺伝子が始まるようにデザインした。増幅した*visA*遺伝子を発現ベクターpJLA503に挿入し、それをpFC3と命名した。プラスミド構築の過程は図3に示した通りである。pJLA503は λ ファージのPR、PLプロモーターを含みCIs857リプレッサーを持つため、培養温度条件によって発現がコントロールできる。pFC3によって大腸菌DH5 α を形質転換しこれをFC103とした。FC103を用いてフェロキレテースの発現を誘導し、SDS-PAGEで全菌体蛋白質を解析したところ、約35kDの蛋白質が大量に発現していた(図9)。これはフェロキレテースの塩基配列から予想されるフェロキレテースの大きさとほぼ同じであった。さらに、このバンドをウエスタンブロッティングしてN末端のアミノ酸配列を解析したところ、確かにフェロキレテースのDNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列と一致した。

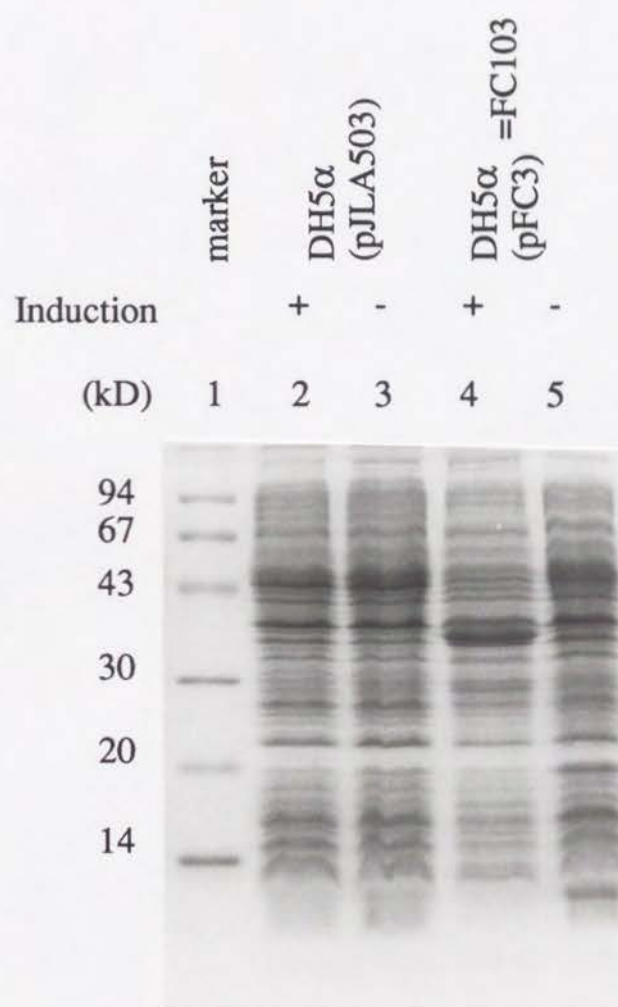


図9 FC103を用いてフェロキレテースの発現を誘導し、SDS-PAGEで全菌体蛋白質を解析したところ、約35kDの蛋白質が大量に発現していた。

1、サイズマーカー

2・3、DH5 α にpJLA503ベクターを型質転換したもの

4・5、DH5 α にpFC3を型質転換したもの(FC103)

2・4、温度によって発現を誘発したもの

3・5、誘発していないもの

2)大量精製の過程と精製上の注意点

フェロキレテースの大量発現が確認できたので、次はその精製に取りかかった。この過程は大きく3段階に分けられる。

a)リゾチームによる溶菌とBrij35による可溶化

硫酸沈澱を行う前に、フェロキレテースを大量に発現している大腸菌を超音波によって破碎し、SDS-PAGEによって可溶性分画にあるか不溶性分画にあるかを確認したところ、両方の分画にフェロキレテースのバンドが見られた。これは、菌体内に大量に発現しているために一部のフェロキレテースが沈殿しているためと考えられ、この酵素は凝集しやすい性質のものと考えられる。結晶化のためには可溶化したサンプルが必要なので界面活性剤による可溶化を行った。ほとんどのフェロキレテースを可溶化した状態で抽出するために、超音波による破碎ではなく、リゾチームと界面活性剤を併用する方法(Nakamura & Yura, 1975)を用いた。また、超音波で破碎したサンプルには大量の核酸が含まれていた。この状態では、吸光度を計って蛋白濃度を測定することが正確に行えないので、DNase、RNase処理を併せて行い核酸を分解した。このように処理したサンプルを12000gで遠心しSDS-PAGEで解析したところ、フェロキレテースはほとんどが上清に抽出されて、ほぼ可溶化されたことが確認された。この段階でDTT、EDTAがフェロキレテースの安定化のために必要なことを見だし、さらに、様々な界面活性剤のうちBrij35が最も効果があり、後の精製段階への影響が少ないことも見いだした。

b)硫酸分画

次に、可溶化されたフェロキレテースを硫酸アンモニウムによる塩析によ

って分画した。まず、20%飽和の硫安存在下では、ほとんど沈澱は生じなかった。次に、40%飽和にすると、沈澱が生じ12000gで遠心した。すると、この沈澱は遠心によって沈まずに浮遊物となった。この浮遊物と上清をSDS-PAGEによって解析するとフェロキレテースは浮遊物中に存在した。この原因については「考察」で述べている。この浮遊物を回収し、TGDEバッファに溶かし、次の段階に用いた。この段階で、さらに硫安濃度を細かく分けて分画を行ってみたが、フェロキレテースを含む沈殿中における精製度は、どの濃度でもほぼ同じであったので、最終的には40%の濃度で一回で沈殿させた。可溶化および硫安分画の過程を図10に示す。

c) Blue-Sepharose CL-6B カラムクロマトグラフィーによる精製

硫安分画で得られたサンプルをBlue-Sepharose CL-6Bカラムを用いて精製した。TGDEバッファで平衡化したカラムにサンプルをロードし、同バッファで洗った。次に、1M KClを加えたTGDEバッファで十分に洗った。1M KClを加えたTGDEバッファで十分に洗うことが、後にカラムから溶出する段階で精製度を高める上で必要であった。さらに、1.5M KClと1%コール酸ナトリウムを加えたTGDEバッファでフェロキレテースを溶出した。この段階でコール酸ナトリウム以外にもTriton X-100、Brij35、Brij58、SDS、Twin20などの様々な界面活性剤を用いたが、コール酸ナトリウムで溶出した場合が最も精製度が高いフェロキレテースが溶出された。得られたサンプルをSDS-PAGEで解析したところ、単一バンドのサンプルが得られた。このサンプルを逆相HPLCで解析したところ単一ピークが観察され、このサンプルが精製酵素標品として十分であることが示された。Blue Sepharose CL-6Bカラムによる精製の過程を図11に、SDS-PAGEによる精製各段階のサンプルの精製度を図12に示してある。後に、Sephacryl S-300カラムによってゲルろ過を行ったサンプルと精製度を比較したが、この段階のサンプルと大差なく、こ

結 果

の段階のサンプルで精製酵素標品として十分であることがわかった。精製サンプルの逆相HPLCによるピークは後の図17Aに示してある。当初は、精製の段階でかなり分解産物が見られたが、バッファー中にEDTAを加えることでかなり防げるようになった。

3段階の精製で4リットルの大腸菌培養から、約90mgの精製酵素標品を得ることができた。回収率は17.1%であった。

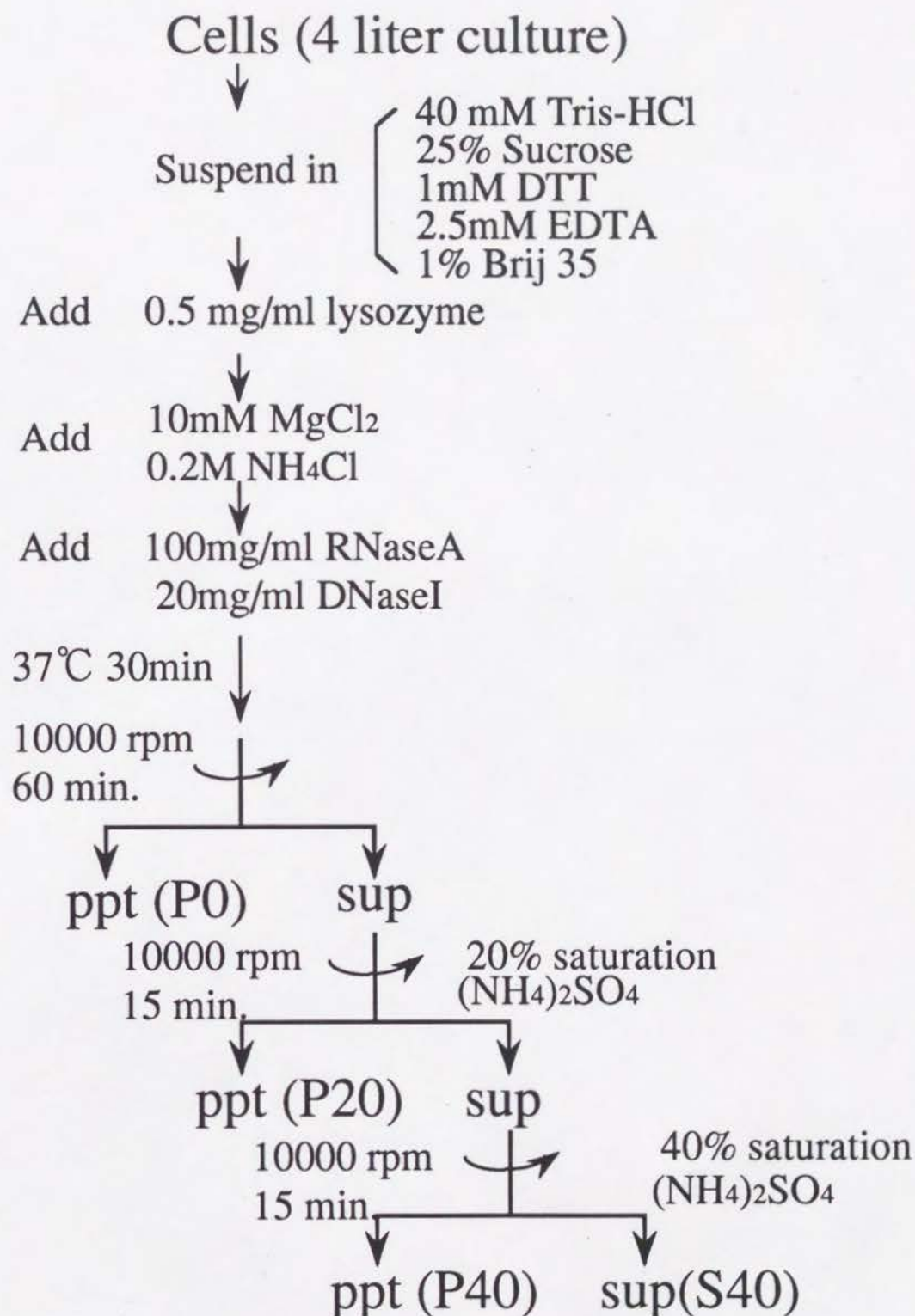


図10 大腸菌フェロキレテースの精製の過程
(1)可溶化および硫酸分画

P40 sample

[40% saturation of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]

↓ dialysis with TGDE buffer

{ 25mM Tris-HCl
20% glycerol
1mM DTT
2.5mM EDTA

Applied on

Blue Sepharose CL-6B

(2.2X20 cm)

equilibrated with TGDE buffer



Wash with 150 ml of TGDE buffer



Wash with 1 liter of TGDE + 1M KCl



Elution with 200 ml of TGDE +
1.5M KCl + 1% sodium cholate

図11 大腸菌フェロキレテースの精製
(2)Blue Sepharose CL-6Bによるカラムクロマトグラフィーの
過程を示した。

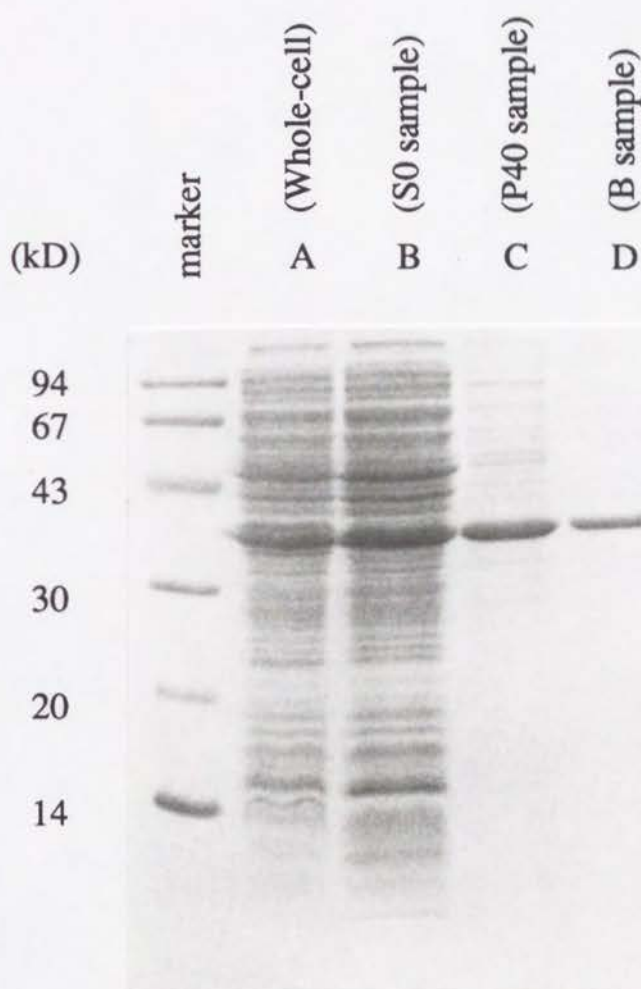


図12 精製各段階の精製度

精製の各段階におけるサンプルの精製度をSDS-PAGEで解析した。

- A、全細胞抽出物
- B、可溶化サンプル
- C、硫安分画サンプル
- D、Blue Sepharose CL-6Bサンプル

3)大腸菌フェロキレテースの生化学的性質の測定

精製したフェロキレテースを用いて様々な生化学的解析を行った。

a)酵素活性の測定

精製の各段階のサンプルの活性を測定し、精製の効率を推定した。活性測定の方法は、様々な方法が報告されているが、ここでは、ピリジンヘモクローム法を用いた(Taketani & Tokunaga, 1981)。その結果、可溶化の段階で56.5%、硫酸分画の段階で19.9%、Blue-Sepharoseカラムの段階で17.1%の活性が残っていることがわかった(表5)。さらに、鉄イオン、プロトポルフィリンIXに対する K_m 値を求めたところ、鉄イオンに対しては3.22mM(図13)、プロトポルフィリンIXに対しては3.77 μ M(図14)の値が示された。また、比活性を測定したところ、約290(u/mg protein)で、哺乳類の酵素と比較すると、かなり低い値が示された。また、酵素活性の最適pHを測定したところ、pH8.0で最も酵素活性が高いことが示された(図15)。

b)Sephacryl S-300による分子量測定

精製したフェロキレテースの実際の分子量を知るためにSephacryl S-300カラムによってゲルろ過を行った。Blue-Sepharose CL-6Bカラムからの溶出と同じバッファー(TGDE + 1.5M KCl + 1% コール酸ナトリウム)で溶出を行った結果、フェロキレテースは分子量は約35000と推定された(図16)。ところが、コール酸ナトリウムのない条件で行うと、この酵素はblue dextranと同じ所で溶出し、コール酸ナトリウムがないと非常に凝集しやすいことがわかった。なお、コール酸ナトリウム存在下で溶出した酵素でも活性は保持されていたので、この酵素は単量体で働いていることが示された。

c) アミノ酸シーケンスによるペプチドマッピング

先のBlue-Sephtose CL-6Bによって溶出した精製酵素の純度を逆相HPLCによって確認した。その結果、精製酵素を逆相HPLCにかけると1つのピークしか現れないことが判った(図17A)。フェロキレテースのアミノ酸の一次構造を確認するために図17Aのピークを分取し、LEPで処理した後、さらに逆相HPLCで主なピークを分取して、アミノ酸配列を決定した。図17Bに一次構造を決定したピークを示している。アミノ酸配列の決定によって確認したアミノ酸を図18に太字で示してある。

d) 等電点の測定

Vesterbergらの方法(Vesterberg, 1971)を用いて等電点を測定したところ、等電点は約4.7と決定された。この値は、他の生物種のフェロキレテース[yeast で6.3: Camadro and Labbe, 1988]と較べて、かなり酸性である。

e) CD測定による α -helix・ β -sheet含量の推定

精製酵素標品を用いて円二色性変換(CD)測定を行い、 α -helixと β -sheetの含量を計算した。図19にCDのデータを示す。このCDデータよりコンピュータを用いて α -helixと β -sheetの含量を計算した(Provencher & Glöckner, 1981)ところ、 α -helixは約10%、 β -sheetは約39%と推定され、この蛋白質はかなり β -sheetに富んでいることがわかった。

Fraction	Total protein (mg)	Total activity (u)	Specific activity (u/mg)	Yield (%)
Cell lysate	2700	152570	56.5	100
Soluble fraction (S0 sample)	1600	86200	53.8	56.5
Ammonium sulfate solution (P40 sample)	294	30400	103.4	19.9
Blue Sepharose CL-6B (B sample)	90	26134	290.4	17.1

表5 大腸菌フェロキレターズの精製効率

精製の各段階でのサンプルを用いて活性測定をし、蛋白質質量あたりの活性を求めた。
1 u は1nmolのプロトヘムを37℃30分で作る活性を表わしている。

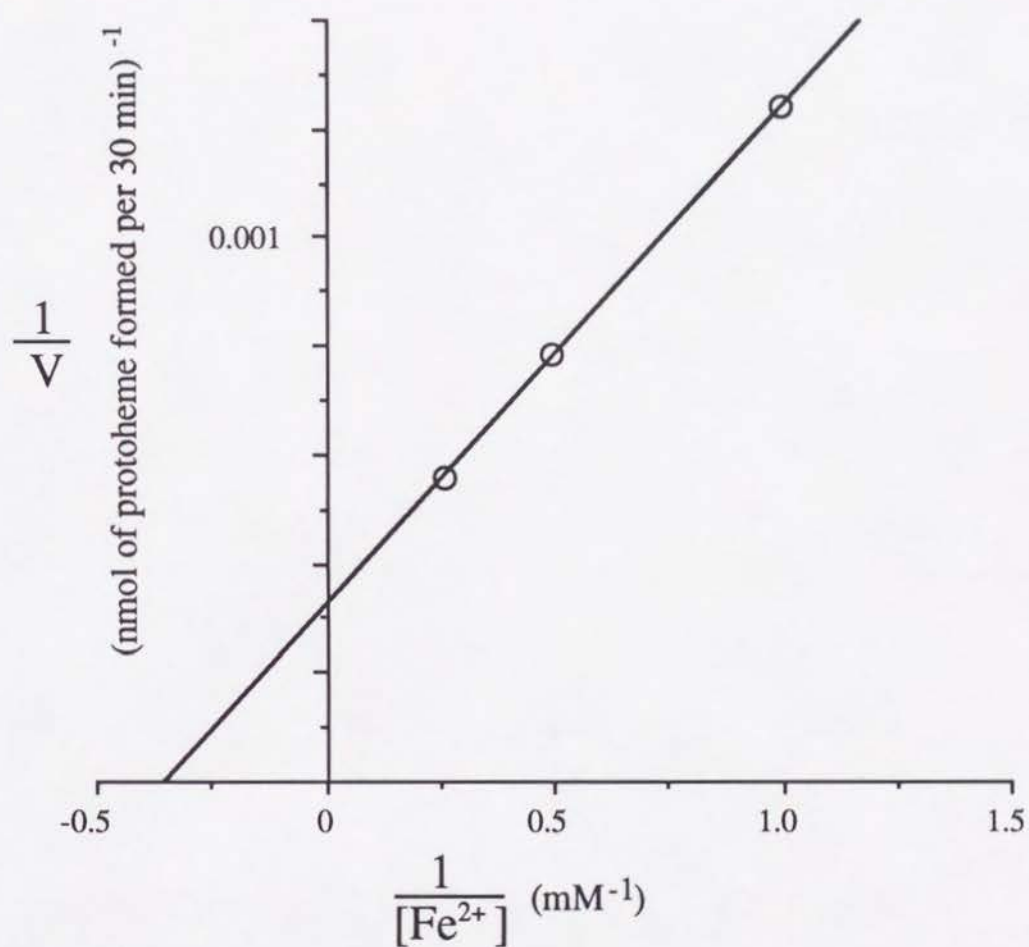


図13 大腸菌フェロキレターズの鉄イオンに対する基質親和性
鉄イオン濃度を変えて大腸菌フェロキレターズの活性測定を行い K_m 値を測定した。鉄イオンに対する K_m 値は約3.22mMである。

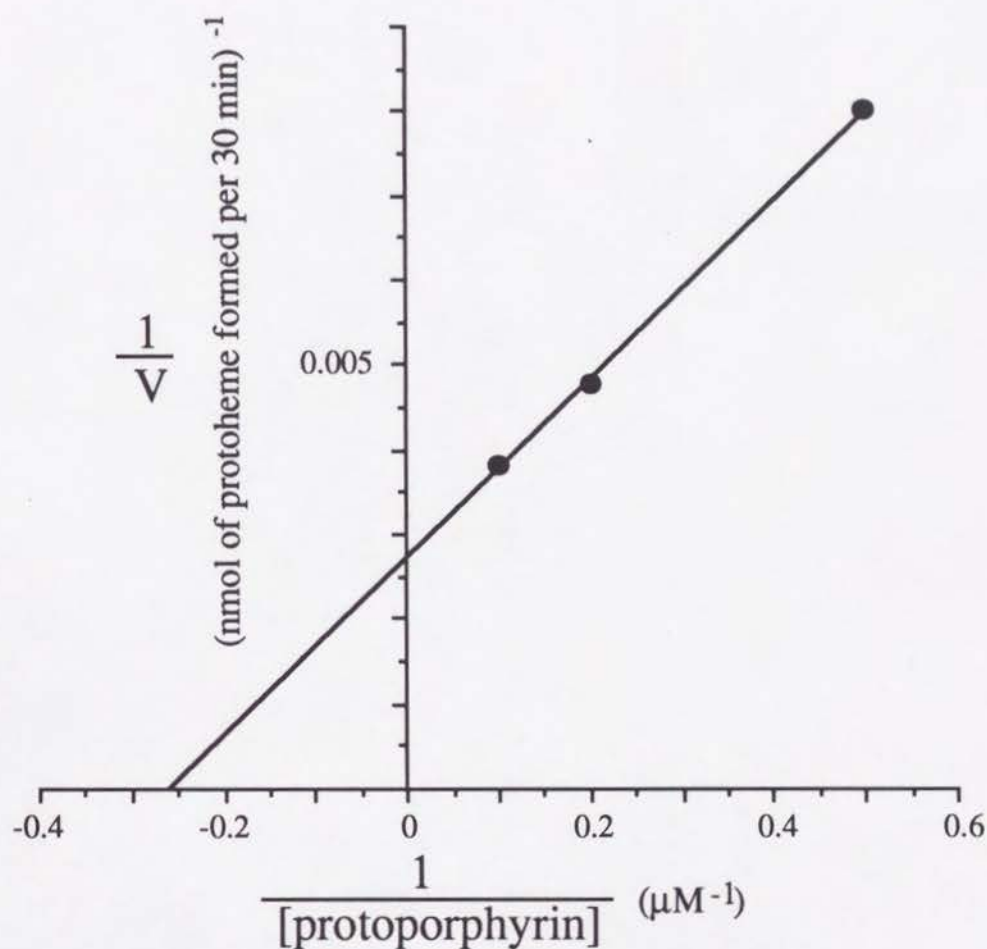


図14 大腸菌フェロキレタースのプロトポルフィリンIXに対する基質親和性

プロトポルフィリンIX濃度を変えて大腸菌フェロキレタースの活性測定を行い K_m 値を測定した。プロトポルフィリンIXに対する K_m 値は約 $3.77\mu\text{M}$ である。

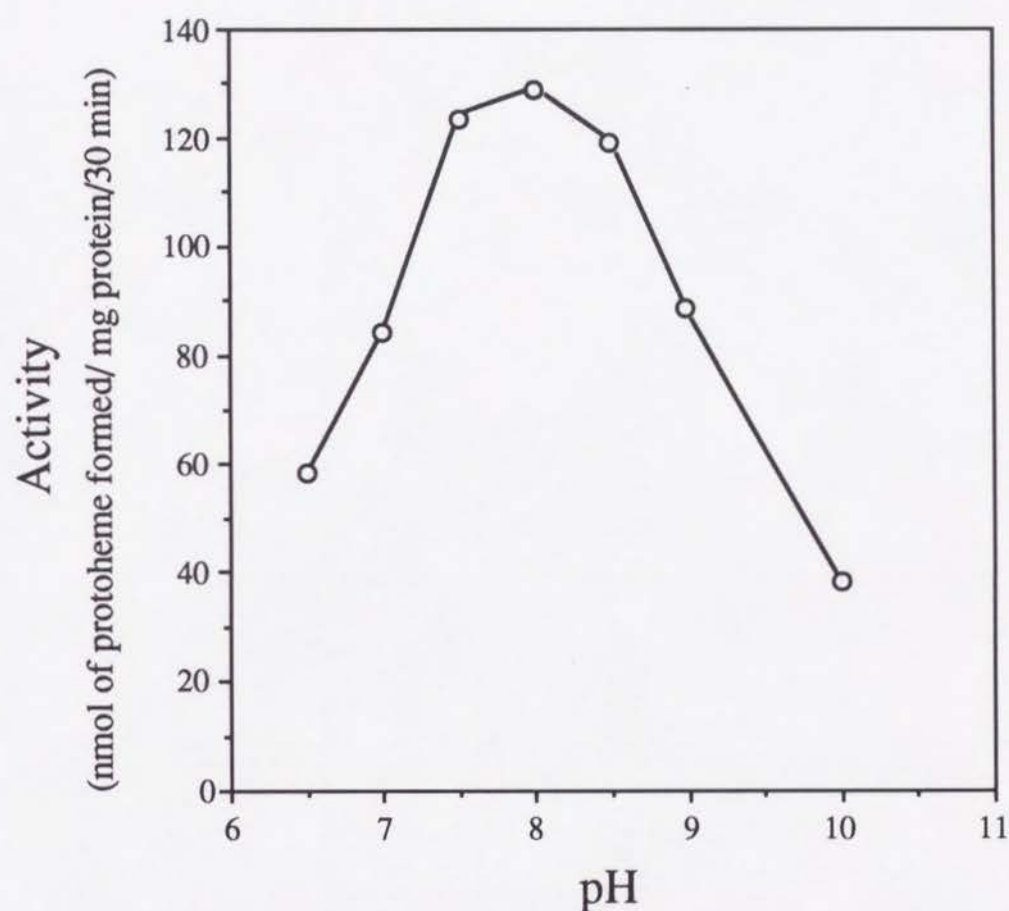


図15 大腸菌フェロキレターズの至適pH

大腸菌フェロキレターズの至適pHを求めた。活性測定の実験溶液のバッファーを様々な値に変化させ、同じ酵素量での活性の値を測定した。

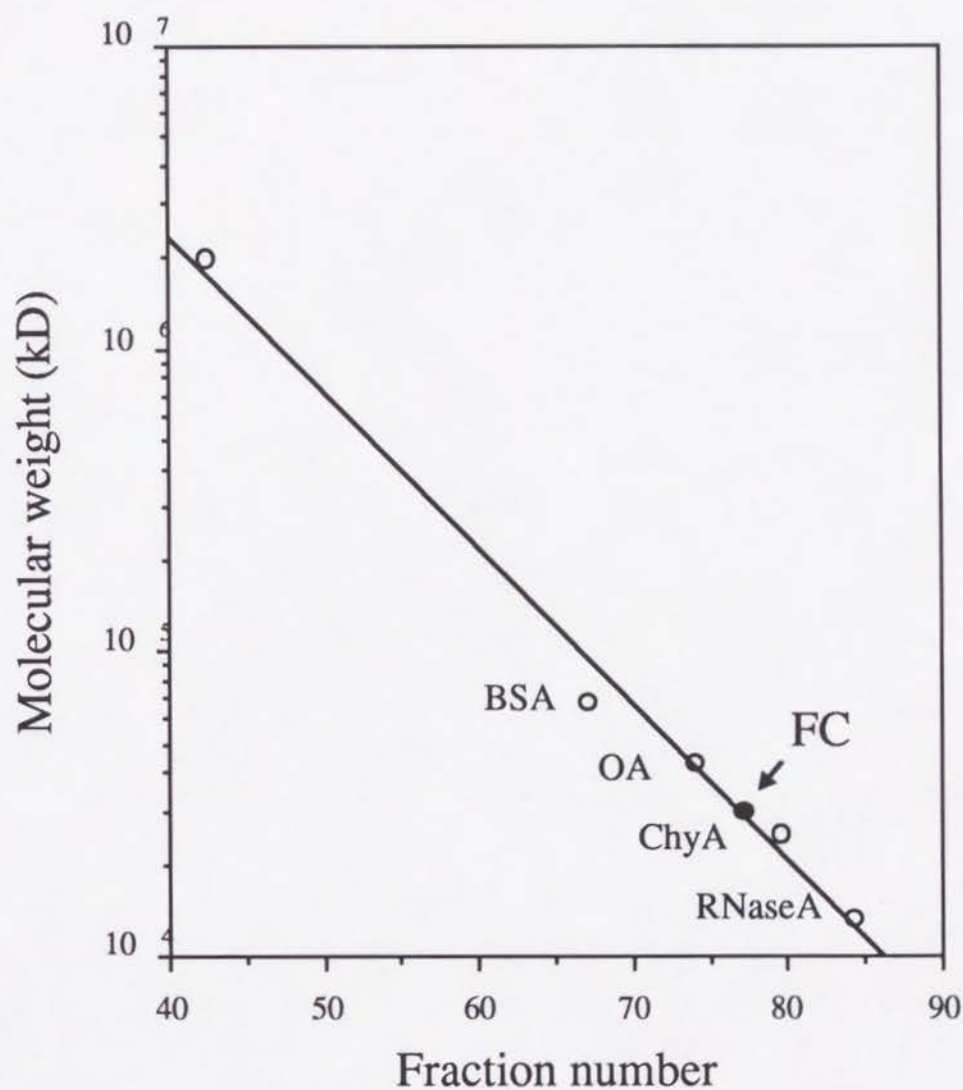


図16 Sephacryl S-300カラムによる分子量測定

Sephacryl S-300カラムによるゲルろ過を行いフェロキレテースの分子量を推定した。1%コール酸ナトリウムの条件では、フェロキレテースは分子量約35000ぐらいの所で溶出した。

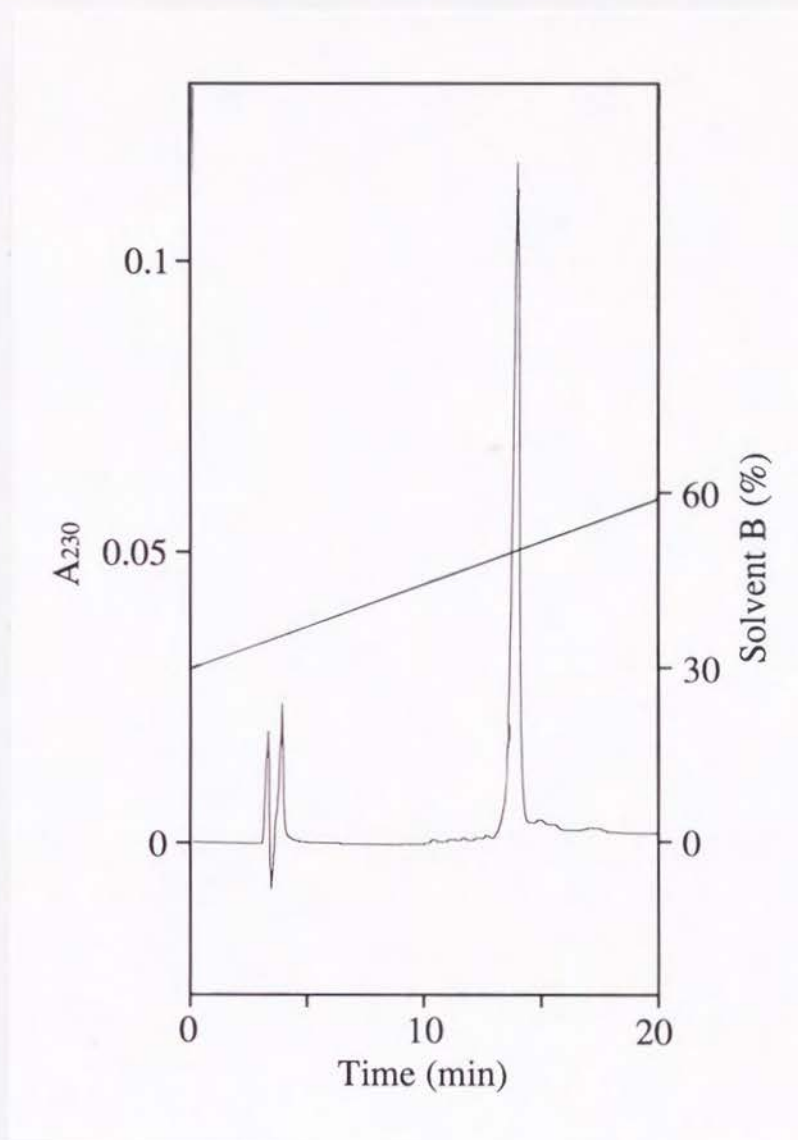


図17A 逆相HPLCによるフェロキレテースの純度の確認

先のBlue-Sephrose CL-6Bによって溶出したサンプル (Bサンプル) の純度を逆相HPLCによって確認した。その結果、Bサンプルは逆相HPLCでは1つのピークしか現れないことが判った。サンプルは100 μ l インジェクトし、RP-300(ϕ 4.6 \times 250 mm)カラムを用い、1 ml/minで溶出を行った。溶媒には、

溶媒A；0.1% TFA

溶媒B；0.05% TFA-アセトニトリル

を用い、溶媒Bの割合を20%から60%に増加させて溶出を行った。

B.

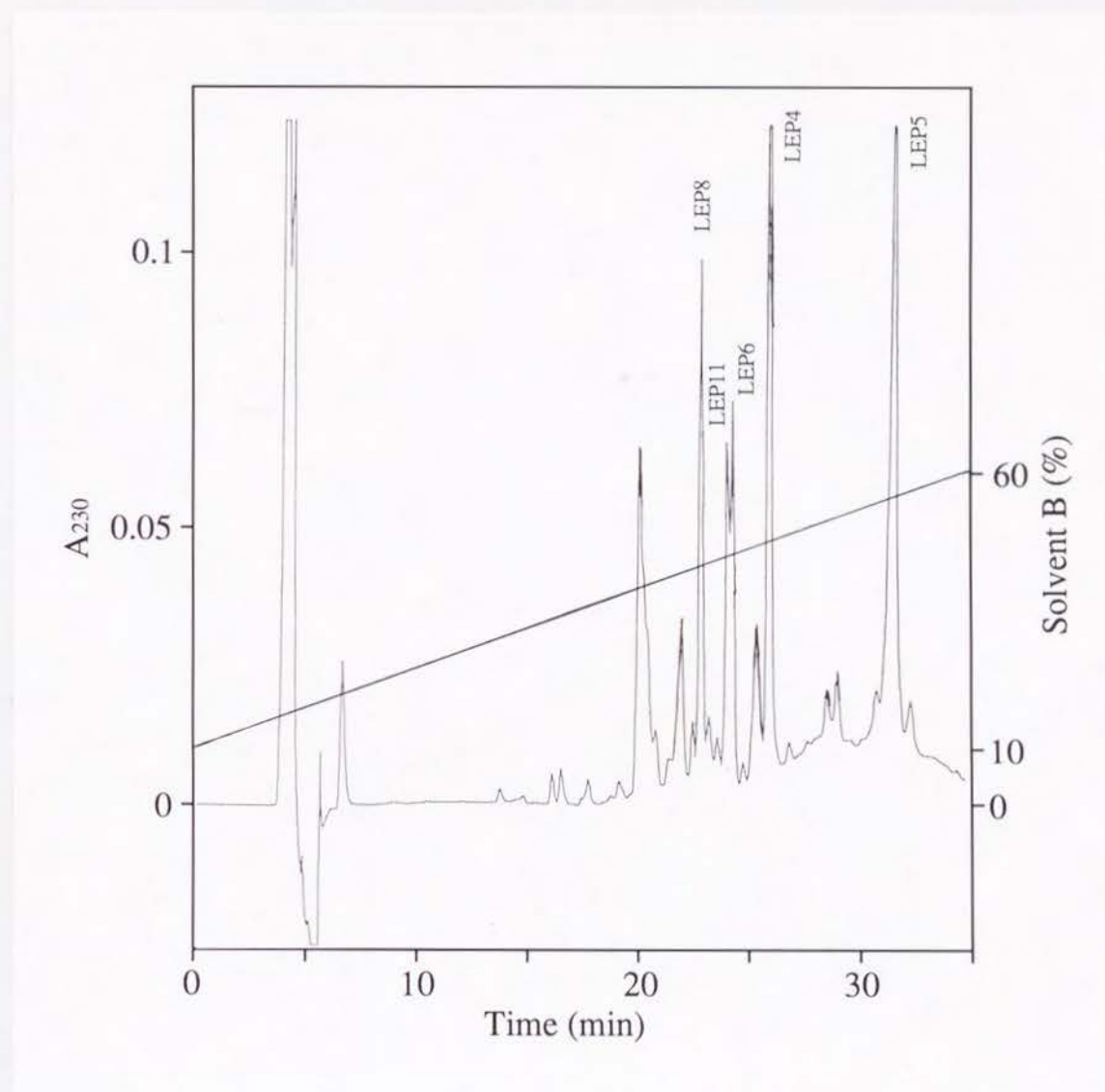


図17B LEPによるアミノ酸マッピング

フェロキレタースのアミノ酸の一次構造を確認するためにAのピークを分取し、LEP (lysine-end-protease) を37℃で30分処理した後、逆相HPLCでピークを分取して、アミノ酸配列を決定した。図中に一次構造を決定したピークを示している。



図18 アミノ酸の一次構造の確認

17Bで分取したピークをそれぞれアミノ酸配列を決定して、フェロキレテースの一次構造の一部を確認した。LEPで切断される部位を矢印で示してある。LEPによってフェロキレテースは12本のペプチドに分かれる。それをLEP1～LEP12とした。アミノ酸配列の決定によって確認したアミノ酸を太字で示してある。

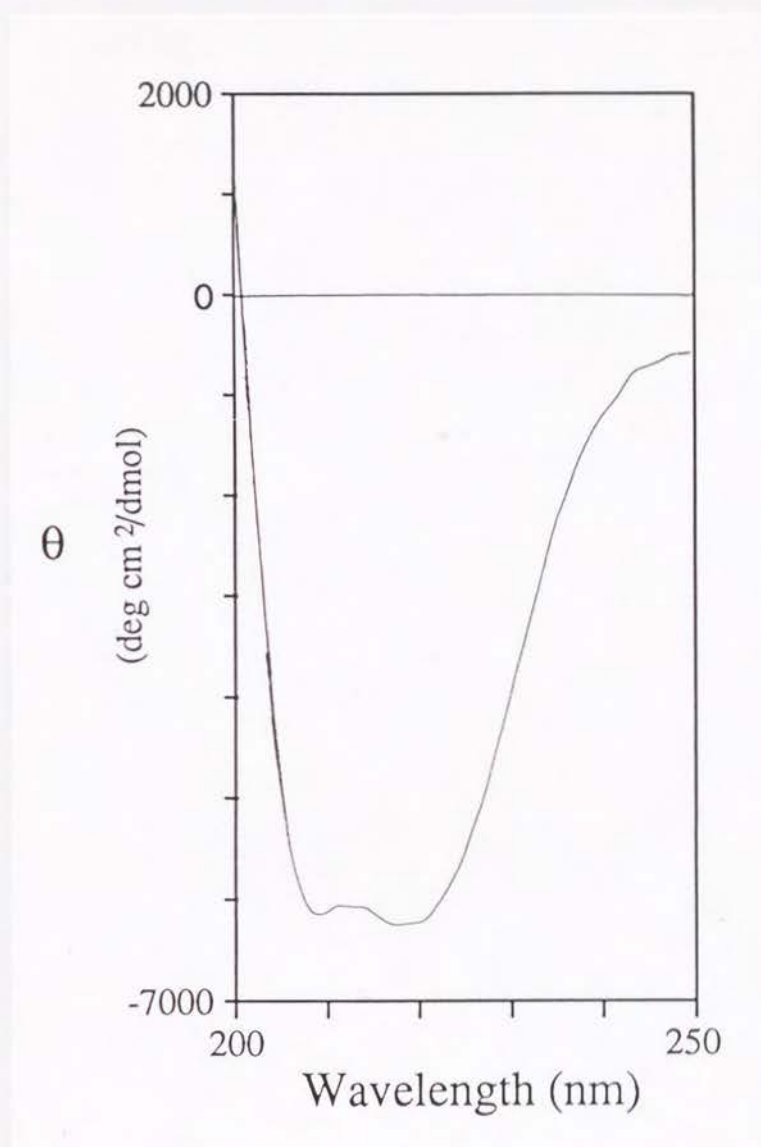


図19 CD測定による蛋白質の構造予測

精製酵素標品を用いて円二色性変換(circular dichroism; CD)測定を行った。測定にはJ-600型CD測定装置(日本光学(株)、東京)を用いた。測定用セルは2mm厚の物を使用した。サンプルは、精製酵素を 25 mM Tris-HCl(pH 8.0)、20% glycerol、1 mM DTT、2.5 mM EDTA 溶液で希釈して使用した。蛋白質濃度は0.22 mg/mlである。

第三節 植物のフェロキレテース遺伝子の解析

1) 大麦およびキュウリ子葉のcDNAライブラリーよりフェロキレテース遺伝子の分離

大腸菌のフェロキレテースの欠失変異株(VS200)を用いて、大麦およびキュウリ子葉のcDNAライブラリーから、フェロキレテース遺伝子を含むクローンを分離した。この研究においては、植物のcDNAライブラリーからフェロキレテースを含むクローンを分離する手段として、大腸菌フェロキレテースの欠失変異体(VS200)を用いて、その表現型を相補するクローンを分離した。当初、キュウリのライブラリーを用いて可視光感受性を相補するクローンを探していたが、分離に成功せず、植物のクローンは大腸菌内では発現しないものと考えた。そこで、その時点で遺伝子配列の判明していた4種のフェロキレテース(大腸菌、酵母、マウス、ヒト)の保存領域に対して合成プライマーを作り、PCR法で増幅してクローニングすることを考えた。この方法で増幅した数本のPCRフラグメントをクローニングし、塩基配列を解析したがフェロキレテースとホモロジーのあるクローンは分離できなかった。そこで、大麦のcDNAライブラリーを用いて、この欠失変異体のもう一つの表現型である成長が悪くなることを利用することを考えた。大腸菌VS200($\Delta visA$)株はフェロキレテースの遺伝子 $visA(=hemH)$ を欠失していることによって可視光感受性になるとともに成長が著しく悪くなる。これはヘムが作られないため、チトクロムが合成できず、結果として酸素呼吸が不可能で、解糖系のみによって生きているためと思われる。VS200株のこの性質を相補するクローンを選択するため、大麦およびキュウリ子葉のcDNAライブラリーを大腸菌VS200($\Delta visA$)株に感染させ、プレートにまいた後、暗所において培養し、成長の良いコロニーを分離した。それぞれのライブラリーから出現した数個ずつのコロニーを選び、バクテリアを増やして高温(42℃)による誘発によっ

て溶原化していたファージを分離したのち、そのDNAを抽出した。図20にファージの感染によってVS200株の生育が著しく良くなる様子を示す。挿入DNAの解析の結果、大麦およびキュウリ子葉ともに全てのファージが約1.8kbの*EcoRI*断片を含んでいた。そこで、大麦・キュウリ子葉からそれぞれ1つのクローンを選び(大麦; BA1、キュウリ子葉; CU3)以下の解析に用いた。大麦・キュウリ子葉ともに成長が良くなるクローンを暗所にて分離したが、もう一つの表現型である可視光感受性については、大麦・キュウリ子葉で違う結果が出た。大麦の場合は成長とともに可視光感受性も相補したが、キュウリ子葉の場合は可視光感受性は相補しなかった。

2)cDNAの再クローニングとDNAシーケンシング

大麦・キュウリ子葉ともに、誘発したファージの挿入DNA断片を*EcoRI*で切断し、LMPアガロースで精製した。この*EcoRI*断片をプラスミドpUC118に挿入した。大麦のcDNAを両方向にpUC118に挿入したものをそれぞれpBA10、pBA11、キュウリ子葉のcDNAをpUC118に挿入したものをpCU34とした。キュウリの場合は、遺伝子の方向とpUC118上の*lacZ*遺伝子の方向が同じであるものは、プラスミドのコピー数が少なく、プラスミドの収量が少なかった。そこでpHSG399にクローニングし、それをpCU98とした。それぞれのプラスミドを用いて欠失変異体を作成し、塩基配列を決定した[図21(大麦)、図22(キュウリ)]。それぞれのcDNAの塩基配列からORFがとれ、それぞれのアミノ酸配列を解析したところ、筆者が以前に報告した大腸菌フェロキレテースのアミノ酸配列と、それぞれ32.0%と31.4%のホモロジーがあり、このcDNAはフェロキレテースをコードしていると結論した(図23のBarley、Cucumber、*E. coli*の欄参照)。

3)植物フェロキレテースとその他の生物のフェロキレテースの類似性

筆者が以前に報告した大腸菌を含めて、フェロキレテースの遺伝子は現在までに6種で報告されているが、植物のものは含まれておらず、植物のフェロキレテース遺伝子の塩基配列の決定は初めてである。大麦・キュウリ子葉を含めた8種のフェロキレテースのアミノ酸配列のアライメントを図23に示す。6種以上のフェロキレテースの間で保存されているアミノ酸残基を星印(*)で、4種以上で保存されているアミノ酸残基をピリオド(.)で示してある。真核生物の場合はORFに先導ペプチドを含んでいるが、これまでに報告されている真核生物(酵母、マウス、ヒト)のフェロキレテースの成熟酵素は、酵母の場合32番目のアスパラギンから、マウスの場合54番目のトレオニンから、ヒトの場合55番目のグリシンから始まると報告されている(Labbe-Bois, 1990; Taketani *et al.*, 1990; Nakahashi *et al.*, 1990b)。これらの情報から、大麦およびキュウリ子葉のフェロキレテースの成熟酵素は、図23中の矢印の付近から始まるものと推測した。大麦・キュウリ子葉を含めた8種のフェロキレテースの相互間のホモロジーは図24の通りである。右上には先導ペプチドも含めたORFでのホモロジーを、左下には成熟酵素(大麦およびキュウリ子葉は予想である)でのホモロジーを示してある。さらに、8種類のフェロキレテースのホモロジーから求めた進化系統樹を図25に示す。ここで、枯草菌だけは他の原核生物と系統樹上離れた位置にある。

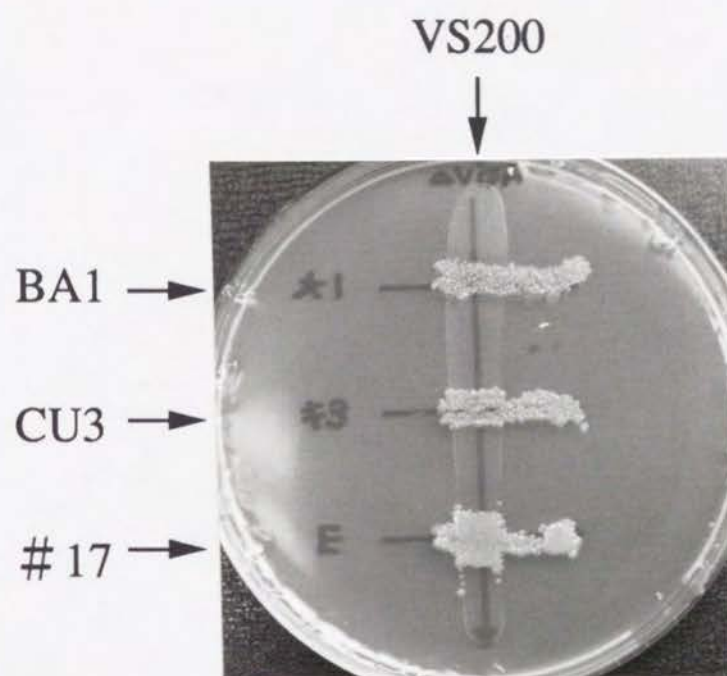


図20 cDNAクローンのVS200に対する相補性

大麦およびキュウリ子葉のフェロキレテースを含むcDNAクローンの大腸菌VS200株の成長に対する相補性を示した。プレートは暗所にて培養している。

BA1；大麦フェロキレテースを含むcDNAクローン

CU3；キュウリ子葉フェロキレテースを含むcDNAクローン

#17；大腸菌フェロキレテースを含むλファージ

1 GAATTCGCGGCCGCTGGGGAAGAAGACGCCAGAGTCACAACCCGCCGAGATCTCCTCCGTCTCCGCGACCAGCCCCGCTTTGTCCTCCATGGAGTGC
M E C V

101 TCCGCTCGGGGGCTCTTGATCTGGGGCGCTCCGGAAATTTCTTGGGGAAGAGCGGCTCCACGACGTCATGTGGTAAAGTCAGATGTTCTACAAACCTTGC
R S G A L D L G R S G N F L G K S G S T T S C G K V R C S T N L A

201 TGGTTCTACCAAATGTGAGCAGAACTTGCATGGGAAGGCTAAACCCCTTGCTGTTGTCAGCAAGTGGAAAAGCAAGGGGAACCTCTGGTTTGGTTTCACAGA
G S T K C E Q N L H G K A K P L L L S A S G K A R G T S G L V H R

301 AGTCCAGTACTTAAACATCAGCACCATCTTTCTGTGAGATCCACCTCTACCGATGTATGTACTACTTTTCGATGAAGATGTCAAAGGTGTATCTTCACATG
S P V L K H Q H H L S V R S T S T D V C T T F D E D V K G V S S H A

401 CCGTCGAAGAAAAGGTTGGAGTGCTCTTATTAAATCTTGGTGGTCCAGAGACCCTCAATGATGTTCAACCATTTTTGTTCAACCTCTTCGCTGATCCAGA
V E E K V G V L L L N L G G P E T L N D V Q P F L F N L F A D P D

501 TATCATTCGACTCCCTAGGCTGTTTCAAGTTTCTTCAAAGACCACTGGCCAAACTTATATCTACTTTTAGAGCTCCTAAGAGTAACGAGGGGTATGCCTCA
I I R L P R L F R F L Q R P L A K L I S T F R A P K S N E G Y A S

601 ATTGGTGGTGGATCACCTCTGCGGAAAATTACCGACGAGCAGGCAAATGCTTTGAAGGTTGCACTAAAAAGTAAGAACTTGAAGCAGATATTTATGTTG
I G G G S P L R K I T D E Q A N A L K V A L K S K N L E A D I Y V G

701 GAATGCGGTATTGGTACCCATTACCGAAGAAGCCATTGATCAGATTAAGAAGGATAAAATCACAAAGCTTGTGGTTCTTCCACTATACCCTCAATACTC
M R Y W Y P F T E E A I D Q I K K D K I T K L V V L P L Y P Q Y S

801 CATATCAACAAGCGGATCTAGCATCCGCGTTCTCCAAAACATTGTCAAGGAAGATCCATACTTTGCTGGCTTGCCAATTTCCATTATTGAATCTTGGTAC
I S T S G S S I R V L Q N I V K E D P Y F A G L P I S I I E S W Y

901 CAGCGCGAGGGCTATGTGAAATCAATGGCTGACTTAATTGAGAAGGAACTATCTGTTTTTTTGAATCCTGAAGAGGTTATGATATTCTTCAGTGCACATG
Q R E G Y V K S M A D L I E K E L S V F S N P E E V M I F F S A H G

```

1001 GAGTACCACTTACCTATGTTAAGGATGCTGGAGATCCATACAGAGATCAGATGGAAGACTGCATTGCTTTGATCATGGAGGAGTTGAAATCCAGAGGAAC
    V P L T Y V K D A G D P Y R D Q M E D C I A L I M E E L K S R G T
1101 CTTGAATGACCATACTCTGGCCTACCAGAGTCGCGTGGGACCAGTTCAATGGCTTAAGCCATATACTGATGAAGTTTTAGTTGAACTTGGTCAAAGGGT
    L N D H T L A Y Q S R V G P V Q W L K P Y T D E V L V E L G Q K G
1201 GTTAAGAGTCTCCTGGCTGTCCCAGTAAGCTTTGTGAGCGAGCATATTGAGACACTGGAAGAAATCGACATGGAGTACAGGGAGTTGGCTCTAGAGTCGG
    V K S L L A V P V S F V S E H I E T L E E I D M E Y R E L A L E S G
1301 GCATTGAGAACTGGGGGAGGGTTCCAGCTCTTGGATGCACCTCATCCTTCATCTCGGACCTCGCTGACGCTGTCGTCGAAGCCCTTCCCTCTGCCTCCGC
    I E N W G R V P A L G C T S S F I S D L A D A V V E A L P S A S A
1401 GATGGCGACCAGAAAGGTCAAGGATACTGACTCTGACATGGACATGATGCATTATCTGACCAAGATGTTCTTGGGCTCGGTCCTGGCCTTCTTCCTGCTG
    M A T R K V K D T D S D M D M M H Y L T K M F L G S V L A F F L L
1501 TTATCGCCGAGGCTAGTTTCTGCTTTCCGGAACACTCTTCAGTGAGCTGCTTATTTTTATCGATGCAACGTGGTTAACCATTTTGGTGATTGTAAGTAGA
    L S P R L V S A F R N T L Q
1601 AACCATATAGACCGTTGAATAATTTATAACTTGTTTTTTTTTGTGGTAGACTGCCATGATAATAACAATATAATTTATGGCCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAA
1701 AAAAAAAAAAAAAAGCGGCCGCGAATTC

```

図21 大麦フェロキレテースのcDNAの塩基配列とアミノ酸配列

大麦のフェロキレテース遺伝子を含むcDNAクローンの挿入断片の塩基配列を示した。フェロキレテースをコードしているORFのアミノ酸配列を塩基配列の下に示してある。アンダーラインで示した部分はリンカーの配列である。

1 GAATTCGCGGCCGCCATTCTTCCTCACTCATTTCTGTACTCAATTTCTTCTCGGGTTTTGGATTTAGATCGTTGTTCTTCCAATTTTCGACTCCATGGAC
M D

101 GCCGCCTCTTCTCTCTCGCCCTCTCCAATATCAAGCTTCACGGTTCACCAATACCCTCAATTCGGATCAAAGAATTTTCATCGTTATGCTCTTTGCCGA
A A S S S L A L S N I K L H G S T N T L N S D Q R I S S L C S L P K

201 AATCTCGCGTGACTTTCTCTTGCAAAACGTCTGGAAATCTGCAAGTTCGTGATAGGTCTACAGGATTAGTGGTTTCTTGTTCTAGCTCCAATGGTGACAG
S R V T F S C K T S G N L Q V R D R S T G L V V S C S S S N G D R

301 AGATGTAATTCAGGGGTACATCTTTCTGGCCCCATTGAGAAGAAAAGCCGTCTGGGGCAAGCATGTTGCTCAGTAGGAACTTTCACCGTTGGTGAATTT
D V I Q G L H L S G P I E K K S R L G Q A C C S V G T F T V G E F

401 GCTTTAGAATCTCAATCTCAGGCAGTGGATGACAAGGTGGGAGTTCTGCTCTTGAATCTTGGAGGGCCGGAAACGCTTGATGATGTCCAACCATTTCTGT
A L E S Q S Q A V D D K V G V L L L N L G G P E T L D D V Q P F L Y

501 ACAATCTATTTGCAGATCCGGATATTATCCGACTCCCAAGGTTGTTCCGTTTTCTCCAAGAGCCATTGGCAAAATTAATATCTACATACCGTGCTCCCAA
N L F A D P D I I R L P R L F R F L Q E P L A K L I S T Y R A P K

601 AAGCAAAGAAGGGTATGCTTCAATAGGAGGTGGCTCACCTTTGCGTAAAATCACAGATGAACAGGCACAAGCGCTTAAAATGGCTTTGGCGGAGAAAAAC
S K E G Y A S I G G G S P L R K I T D E Q A Q A L K M A L A E K N

701 ATGTCTACTAATGTCTATGTGGGAATGCGCTATTGGTACCCTTTACAGAGGAAGCAATTCAGCAAATTAAGAGGGATGGGATAACAAGACTTGTGGTGC
M S T N V Y V G M R Y W Y P F T E E A I Q Q I K R D G I T R L V V L

801 TGCCATTGTATCCACAGTACTCTATTTCTACAACCTGGGTCTAGTATTCGTGTTCTCCAGAAGATGTTTCAGGGAAGATGCATATCTCTCATCGTTGCCTGT
P L Y P Q Y S I S T T G S S I R V L Q K M F R E D A Y L S S L P V

901 TTCAATTATAAAGTCCTGGTACCAGCGGGAAGGTATATTAAGTCAATGGCTGACTTGATGCAGGCAGAGCTGAAGAATTTTGCCAATCCTCAAGAGGTC
S I I K S W Y Q R E G Y I K S M A D L M Q A E L K N F A N P Q E V

1001 ATGATTTTCTTTAGTGACATGGGGTTCCCGTCAGTTATGTTGAGAATGCTGGAGATCCATACAAAGATCAAATGGAAGAGTGCATCTGCCTAATCATGC
 M I F F S A H G V P V S Y V E N A G D P Y K D Q M E E C I C L I M Q
 1101 AAGAGCTGAAAGCCAGAGGAATTGGGAATGAGCATACTCTTGCCATACCAGAGCCGTGTTGGACCTGTACAATGGCTTAAGCCATACACAGATGAAGTTCT
 E L K A R G I G N E H T L A Y Q S R V G P V Q W L K P Y T D E V L
 1201 TGTTGAGCTTGGCCAGAAGGGTATTAAGAGTCTCCTAGCCGTTCCCGTGAGCTTTGTGAGTGAGCACATTGAGACTCTCGAGGAGATAGATATGGAGTAT
 V E L G Q K G I K S L L A V P V S F V S E H I E T L E E I D M E Y
 1301 AAGCACTTGGCACTTGAATCTGGAATCCAAAACCTGGGGCCGTGTGCCTGCCCTCAATTGCAATTCTTCATTTCATTTTCAGATTTGGCTGATGCAGTAATTG
 K H L A L E S G I Q N W G R V P A L N C N S S F I S D L A D A V I E
 1401 AAGCCCTTCCATCCGCAACGGCATTGGCACCCACACAAGTTCAACAGATGCAGATGACCACGATCCCTTCCTATATGCTATCAAATTGTTATTTGGTTC
 A L P S A T A L A P H T S S T D A D D H D P F L Y A I K L L F G S
 1501 GGTCCTTGCGTTCATCTTGTTACTTTACCCAAAGCATTTCATGGTTTTTCAGGAATAATTTCTTTTAAACTATACAAGAATCTACGGATACCGCGGGGAG
 V L A F I L L L S P K A F M V F R N N F L L N Y T R I Y G Y R G E
 1601 AGATCCGAATTTTTTTTGGGTAGACTTATATTTACCTGAGAAAAGAAATAGAAGTTCACCTGCCATACACATTTTCCCGTTTTTCCAAGTGTACTTCTGT
 R S E F F W V R L I F T
 1701 ATTTATATTCACTATAACAATGTATCACACATGGAAGTAAAGGATTCAGGCGGCCGGAATTC

図22 キュウリ子葉フェロキレターゼのcDNAの塩基配列とアミノ酸配列

キュウリ子葉のフェロキレターゼ遺伝子を含むcDNAクローンの挿入断片の塩基配列を示した。フェロキレターゼをコードしているORFのアミノ酸配列を塩基配列の下に示してある。アンダーラインで示した部分はリンカーの配列である。

	1					50	
<i>B. japonicum</i>	
<i>E. coli</i>	結 果
Barley	MECVRS....	GALDLGRSGN	FLGKSGSTTS	.CGKVRCSTN	LAGSTKCEQN		
Cucumber	MDAASSSLAL	SNIKLHGSTN	TLNSDQRISS	LCSLPKSRVT	FSCSTSGNLQ		
HumanMRSILGANMA		
MouseMLSASANMA		
YeastMLS		
<i>B. subtilis</i>		
	51					100	
<i>B. japonicum</i>	MSTAA	
<i>E. coli</i>	
Barley	LHGKAKPLLL	SASGK..ARG	TSGLVHRSPV	LKHQHHLSVR	STSTDVCTTF		
Cucumber	VRDRSTGLVV	SCSSSNGDRD	VIQGLHLSP	IEKKSRLGQA	CCSVGTFTVG		
Human	AALRAAGVLL	RDPLASSSWR	V.....CQP	WRWKSGAAAA	AVTTETAQHA		
Mouse	AALRAAGALL	REPLVHGSSR	A.....CQP	WRCQSGAAVA	A.TTEKVHHA		
Yeast	RTIRTQGSFL	RRSQLTITRS	F.....SVT	F.....NM		
<i>B. subtilis</i>		
	101					150	
	↓	
<i>B. japonicum</i>	PNETTQPTVR	SGQKRVGVLL	VNLGTPDTAD	APGVRVYLKE	FLSDARVIED		
<i>E. coli</i>	MRQTKTGILL	ANLGTDPDAPT	PEAVKRYLKQ	FLSDRRVVDIT		
Barley	DEDEVKGVSSH	AVEEKVGVLL	LNLGGPETLN	..DVQPFLFN	LFADPDIIRL		
Cucumber	EFALES.QSQ	AVDDKGVVLL	LNLGGPETLD	..DVQPFLYN	LFADPDIIRL		
Human	QGAKPQVQPQ	KRKPKTGILM	LNMGGPETLG	..DVHDFLLR	LFLDQDLMTL		
Mouse	KTTKPQAQPE	RRKPKTGILM	LNMGGPETLG	..EVQDFLQR	LFLDRDLMTL		
Yeast	QNA.....	QKRSPTGIVL	MNMGGPSKVE	..ETYDFLYQ	LFADNDLIPI		
<i>B. subtilis</i>	MSRKKMGLLV	MAYGTPYKEE	..DIERYTH		
	151					200	
	
<i>B. japonicum</i>	QGLVWKV..V	LNGIILRQRP	RSKALDYQKI	WNNEKNESPL	KTITRSQSAK		
<i>E. coli</i>	SRLWLP..L	LRGVIFPLRS	PRVAKLYASV	WMEG..GSPL	MVYSRQQQQA		
Barley	PRLFRFLQRP	LAKLISTFRA	PKSNEGYSIGGGSPL	RKITDEQANA		
Cucumber	PRLFRFLQEP	LAKLISTYRA	PKSKEGYASIGGGSPL	RKITDEQANA		
Human	P..I...QNK	LAPFIAKRRT	PKIQEQYRRIGGGSPI	KIWTSKQGE		
Mouse	P..I...QNK	LAPFIAKRRT	PKIQE..RRIGGGSPI	KMWTSKQGE		
Yeast	SAKY...QKT	IAKYIAKFRT	PKIEKQYREIGGGSPI	RKWSEYQATE		
<i>B. subtilis</i>	...IRRGRKP	EPEMPL....	QDLKDRYEAGGISPL	AQITEQQAHN		
	201					250	
	
<i>B. japonicum</i>	LAAALSDRDH	VVVDW....A	MRYGNPSIKS	GIDALIGGMR	PHLAV.PLYP		
<i>E. coli</i>	LAQRLPE...	MPVAL....G	MSYGSPSLES	AVDELLAEHV	DHIVVLPLYP		
Barley	LKVALKSKNL	EA...DIYVG	MRYWYPFTEE	AIDQIKDKI	TKLVVLPLYP		
Cucumber	LKMALAEKNM	ST...NVYVG	MRYWYPFTEE	AIQIQIKRDI	TRLVVLPLYP		
Human	MVKLLDELSP	NTAPHKYIIG	FRYVHPLTEE	AIEEMERDGL	ERAIAFTQYP		
Mouse	MVKLLDELSP	ATAPHKYIIG	FRYVHPLTEE	AIEEMERDGL	ERAIAFTQYP		
Yeast	VCKILDKTCP	ETAPHKPYVA	FRYAKPLTAE	TYKQMLKDG	KKAVAFSQYP		
<i>B. subtilis</i>	LEQHLNEI.Q	DEITFKAYIG	LKHIEPFIED	AVAEMHKDGI	TEAVSIVLAP		
	251					300	
	
<i>B. japonicum</i>	QYSASTSATV	CDEVFRVLAR	LRAQPTL..R	VTPPYEDEA	YIEALAVSIE		
<i>E. coli</i>	QFSCSTVGAV	WDELARILAR	KRSIPGI..S	FIRDYADNHD	YINALANSVR		
Barley	QYSISTSGSS	IRVLQNIKE	DPYFAGLPIS	IIESWYQREG	YVKSMDLIE		
Cucumber	QYSISTTGSS	IRVLQKMFRE	DAYLSSLPVS	IIKSWYQREG	YIKSMADLMQ		
Human	QYSCSTTGSS	LNAIYRYNQ	VGRKPTMKWS	TIDRWPTHHL	LIQCFADHIL		
Mouse	QYSCSTTGSS	LNAIYRYNE	VGQKPTMKWS	TIDRWPTHPL	LIQCFADHIL		
Yeast	HFSYSTTGSS	INELWRQIKA	LDSESRISWS	VIDRWPTNEG	LIKAFSENIT		
<i>B. subtilis</i>	HFSTFSVQSY	NK...RAKEE	AEKLGGLTIT	SVESWYDEPK	FVTYWVDRVK		

	301		350	
	...***	*..* ..	****. ..
<i>B. japonicum</i>	THLATLP...	FKPELIVASF	HGMPKSYV.D	KGDPYQEHCI ATTEALRAAR
<i>E. coli</i>	ASFAKHG...	.EPDLLLSY	HGIPQRYA.D	EGDDYPQRCR TTTRELASAL
Barley	KELSVFSNP.	.EEVMIFFSA	HGVPLTYVKD	AGDPYRDQME DCIALIMEEL
Cucumber	AELKNFANP.	.QEVMIFFSA	HGVPSYVEN	AGDPYKDQME ECICLIMQEL
Human	KELDHFPLEK	RSEVVILFSA	HSLPMSVV.N	RGDPYPQEVs ATVQKVMERL
Mouse	KELNHFPLEK	RSEVVILFSA	HSLPMSVV.N	RGDPYPQEVG ATVHKVMEKL
Yeast	KKLQEFFQPV	RDKVLLFSA	HSLPMDVV.N	TGDAYPAEVA ATVYNIMQKL
<i>B. subtilis</i>	ETYASMPED	RENAMLIVSA	HSLP.EKIKE	FGDPYPDQLH ESAKLIAEG.
	351		400	
	..	* ..**.. **	***.***	* ..* ..
<i>B. japonicum</i>	RLDA..SKLL	LTFQSRF.GN	DEWLQPYTDK	TMERLAK.EG VVRIAVVTPG
<i>E. coli</i>	GMAP..EKVM	MTFQSRF.GR	EPWLMPYTDE	TLKMLGE.KG VGHQVMCPG
Barley	KSRGTLNDHT	LAYQSRV.GP	VQWLKPYTDE	VLVELGQ.KG VKSLLAVPVS
Cucumber	KARGIGNEHT	LAYQSRV.GP	VQWLKPYTDE	VLVELGQ.KG IKSLLAVPVS
Human	...EYCNPYR	LVWQSKV.GP	MPWLGPQTDE	SIKGLCE.RG RKNILLVPIA
Mouse	...GYNPYR	LVWQSKV.GP	VPWLGPQTDE	AIKGLCE.RG RKNILLVPIA
Yeast	...KFKNPYR	LVWQSQV.GP	KPWLGAQTAE	.IAEFLG.PK VDGLMFIPIA
<i>B. subtilis</i>	...AGVSEYA	VGWQSEGNT	DPWLGPDVQD	LTRDLFEQKG YQAFVYVPVG
	401		450	
	* ..**..***	* ..* ..	***.***	* ..* ..
<i>B. japonicum</i>	FAADCLETLE	EIAQENAEIF	KHNGG.ETFS	AIPCLNDSEP GMDVIRTLVL
<i>E. coli</i>	FAADCLETLE	EIAEQNREVF	LGAGG.KKYE	YIPALNATPE HIEMMANLVA
Barley	FVSEHIETLE	EIDMEYRE.L	ALESGIENWG	RVPALGCTSS FISDLADAVV
Cucumber	FVSEHIETLE	EIDMEYKH.L	ALESGIQNWG	RVPALNCNSS FISDLADAVI
Human	FTSDHIETLY	ELDIEYSQVL	AKECGVENIR	RAESLNGNPL FSKALADLVH
Mouse	FTSDHIETLY	ELDIEYSQVL	AQKCGAENIR	RAESLNGNPL FSKALADLVH
Yeast	FTSDHIETLH	EIDLG...VI	GESEYKDKFK	RCESLNGNQT FIEGMADLVK
<i>B. subtilis</i>	FVADHLEVLY	DNDYECKVVT	DDIGA..SYY	RPEMPNAKPE FIDALATVVL
	451		500	
	...			
<i>B. japonicum</i>	RELQGW...
<i>E. coli</i>	AYR.....
Barley	EALPSASAMA	TRKVKDTSD	MDMMHYLTKM	FLGSVLAFFL LLSPLRVSAF
Cucumber	EALPSATALA	PHTSSTDADD	HDFFLYAIKL	LFGSVLAFIL LLSPKAFMVF
Human	SHIQS.....	...NELCSK	QLTLSCPLCV	NPVCRETKSF FTSQQL....
Mouse	SHIQS.....	...NKLCSK	QLSLNCPLCV	NPVCRETKSF FTSQQL....
Yeast	SHLQS.....	...NQLYSN	QLPLDFALGK	SNDPVKDLSL VFGNHEST..
<i>B. subtilis</i>	KKLGR.....
	501		529	
<i>B. japonicum</i>
<i>E. coli</i>
Barley	RNTLQ.....
Cucumber	RNNFLNLYTR	IYGYRGERSE	FFWVRLIFT
Human
Mouse
Yeast
<i>B. subtilis</i>

図23 8種類のフェロキレテースのホモロジー

今回決定した大麦、キュウリ子葉を含む8種類のフェロキレテースのアライメントを示した。6種以上で保存されているアミノ酸の上には星印(*), 4種以上で保存されているアミノ酸の上にはピリオド(.)をアライメントの上部に記している。大麦およびキュウリ子葉の成熟酵素は矢印の付近から始まると思われる。

Predicted Mature	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. japonicum</i>	Yeast	Mouse	Human	Barley	Cucumber
<i>E. coli</i>		25.9	42.2	27.6	26.7	26.4	32.0	31.4
<i>B. subtilis</i>	25.9		20.6	23.6	30.5	28.3	30.5	30.5
<i>B. japonicum</i>	42.2	20.6		21.6	23.9	24.7	29.7	29.1
Yeast	27.6	23.6	21.1		50.4	49.9	36.1	35.3
Mouse	26.7	30.5	23.9	50.6		87.9	39.6	40.1
Human	26.4	28.3	24.9	51.0	91.3		38.4	40.1
Barley	32.0	30.5	30.6	36.1	39.6	39.0		64.8
Cucumber	31.4	30.5	29.4	36.4	40.8	40.1	77.2	

図24 フェロキレテースのホモロジー (%)

筆者が決定した大腸菌・大麦・キュウリ子葉を含めて、現在、塩基配列が知られている8種のフェロキレテースのアミノ酸配列のホモロジーを表に示した。真核生物のアミノ酸配列の場合にはリーダーシーケンスを持っているが、右上には、リーダーシーケンスも含めた上でのホモロジーを、左下には、予想される成熟酵素間でのホモロジーを示している。

文献

筆者らの研究

Miyamoto, K. *et al.*, 1991

Frustaci, J. M. *et al.*, 1992

Hansson, M. *et al.*, 1992

Labbe-Bois, R. 1990

Taketani, S. *et al.*, 1990

Nakahashi, Y., *et al.*, 1991

本研究

本研究

E. coli

B. japonicum

B. subtilis

Yeast

Mouse

Human

Barley

Cucumber

63

図25 フェロキレテースの進化系統樹

8種のフェロキレテースの進化系統樹を示した。理化学研究所のプログラムにネットワークによって接続して解析を行った。

考 察

第一節 プロトポルフィリンIXの蓄積の測定による大腸菌可視光感受性株の解析

筆者は、修士論文においてこの大腸菌可視光感受性変異株を分離してみるとともに、それらの変異株の性質や光感受性に関与する遺伝子(*visA*と命名、*hemH*と同一)を同定し、この遺伝子の解析を行い、その塩基配列を決定した(Miyamoto *et al.*, 1991; Nakahigashi *et al.*, 1991)。その結果、酵母のフェロキレテースの遺伝子である *HEM15* 遺伝子(Labbe-Bois, 1990)と、アミノ酸配列のレベルで約28%の相同性を示すことが判った(図24参照)。よって、*visA* 遺伝子はフェロキレテースをコードする遺伝子であると推定した。ヘム生合成系は図1に示した通りであり、*visA*(=*hemH*) 遺伝子の欠損した株においては前段階のプロトポルフィリンIXが蓄積していることが予想される。プロトポルフィリンIXは405nm付近の励起光により633nm付近の蛍光を発することが知られている(Kouji *et al.*, 1989; Masuda *et al.*, 1990)。そこで、大腸菌の可視光感受性変異株におけるプロトポルフィリンIXの蓄積を菌体抽出物の蛍光を測定することにより調べた(Miyamoto *et al.*, 1992)。

今回、筆者は *visA* 遺伝子の変異による可視光感受性株には、明らかにプロトポルフィリンIXが蓄積していることを、蛍光測定によって確認した。プロトポルフィリンIXは光増感剤として知られ、可視光の照射によって活性酸素を発生し、それが細胞に障害を与えるだろうということが報告されている(Hsu *et al.*, 1971; Krasnovsky, 1979; Poulson *et al.*, 1976)。今回の実験で、これらの変異株にファージまたはプラスミドによって、野生型のフェロキレテースの遺伝子を導入すると、可視光感受性でなくなるが、そうした株ではプロトポルフィリンIXは全く蓄積されなくなることも判った。このことは、明らかに *visA* 遺伝子の欠損と関連して、プロトポルフィリンIXの蓄積がおこっていることを示している。

VS200株の可視光抵抗性復帰株より分離した、*hemA*遺伝子の変異株であるVS215(R515)株では、*hemA*遺伝子に変異が起こり、ヘム生合成系の前段階(図1)でブロックされることによってプロトポルフィリンIXが合成されなくなると思われる。実際に、今回の実験で、VS215株ではプロトポルフィリンIXが蓄積していないことが確認され、可視光感受性変異株はヘム生合成系と密接に関連していることが示された。

別の遺伝子*visB*の変異による可視光感受性株(VS550)では、プロトポルフィリンIXの蓄積は見られず、*visB*遺伝子の変異による可視光感受性はプロトポルフィリンIXの蓄積によるものではないことが示された。このことから、大腸菌の可視光感受性は必ずしもプロトポルフィリンIXの蓄積によってのみ起こるのではなく、他の機構で起こる場合もあることが示された。この*visB*遺伝子は筆者らの研究室での研究によって、ユビキノン合成系の遺伝子であることが確認されている(Nakahigashi *et al.*, 1992)。

フェロキレテースに欠損が起こっているとき、前段階の物質であるALAを過剰に加えたらヘム生合成系はどうなるか、また、フェロキレテースの産物であるヘムを加えたらヘム生合成系は抑制されるのかを知る目的で、培地中にALA・ヘムが存在するときにプロトポルフィリンIXの蓄積に変化が見られるかを調べたところ、どちらを加えた場合においてもプロトポルフィリンIXの蓄積量は増加した。ALAはプロトポルフィリンIXの前駆体であるので、プロトポルフィリンIXの蓄積量が増加するのは予想通りである。ところが、ヘムを加えたときは、ヘム生合成系が抑制されて、プロトポルフィリンIXの蓄積量が減少することを予想したが、結果は逆に増加していた(表3)。普通の大腸菌株はヘムを細胞内に透過しないので、ヘムを培地に加えただけでは細胞内にヘムは到達しておらず、細胞内ではヘムが不足している状態であるのかも知れないので、VS200株より分離したヘム透過性変異株(VS281)を用いても同様の実験を行なった(表4)。この場合でもVS101の場合と同様、ヘム存在下ではプロトポルフィリンIXの蓄積量が増加していた。培地中のヘムが細

胞内に取り込まれ、何らかの原因で鉄イオンがはずれプロトポルフィリンIXに戻っているようなことも考えられるが、その場合にはヘムの添加量が多いほどプロトポルフィリンIX量が多くなるはずであり、表3の結果とは矛盾する。これらの事実より、培地中にヘムが存在すると、ヘム生合成系がかえって活性化する何らか機構の存在が考えられ、大腸菌におけるヘムの主要な役割である酸素呼吸と関連させて次のように考えることができる(図26に図解)。まず、ヘムが存在することによって大腸菌はチトクロムが合成できるようになり酸素呼吸が可能となる。酸素呼吸を始めると大腸菌は活発に分裂して成長し、そのためにさらに多くのチトクロムを必要とする。よって、ヘム生合成系はヘムが少量存在するとより活性化される仕組みになっているのかもしれない。表3の結果は20 μ Mのヘムではヘム生合成系は15倍にも活性化されているが、50 μ M以上では2倍程度と低くなっている。この結果は、この仮説を裏付けているものと思われる。

筆者らの以前の実験(Nakahigashi *et al.*, 1991)では嫌氣的条件の時には可視光感受性は見られず、この可視光感受性には酸素が関与することが示されている。プロトポルフィリンIXは光増感剤(伊藤ら、1988)として知られ、可視光の照射によって、酸素分子から活性酸素を生成する反応を触媒することが知られている(Hsu *et al.*, 1971; Kravinsky, 1979; Poulson *et al.*, 1976)。図27に活性酸素の種類とそれに対応する消去遺伝子を示している。細胞には、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)やカタラーゼといった活性酸素を除去する酵素が存在していて(米井ら、1988)、通常の野生株では、それらの酵素や他のシステムによって、活性酸素による障害から守られていると考えられる。今回解析した可視光感受性株では、フェロキレターズの変異によるプロトポルフィリンIXの蓄積により、それらのシステムの処理能力以上の多量の活性酸素が発生しているか、それらのシステムでは処理できないような活性酸素種が発生して、細胞を死に到らしめられるものと推定できる。スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)やカタラーゼといった活性酸素を除去する酵素の

遺伝子(*sod*や*kat*)は、その活性酸素ストレスによって発現が誘導されることが示されている(Niederhoffer *et al.*, 1990; Richter & Loewen, 1981)。筆者らは以前の実験(Nakahigashi *et al.*, 1991)で、VS101株やVS200株に*sod*や*kat*遺伝子のプロモーターと*lacZ*遺伝子の融合遺伝子を導入して、可視光による発現の上昇を調べた。ところが、*sod*遺伝子も*kat*遺伝子とともに発現の上昇は見られず、プロトポルフィリンIXによって発生する活性酸素はスーパーオキシドでも過酸化水素でもないと考えた。*in vitro*の系では、プロトポルフィリンIXから一重項酸素が発生することが報告されている(Krasnovsky, 1979)こともあって、筆者らはプロトポルフィリンIXによって発生する活性酸素種は一重項酸素である可能性を考えた。ただし、プロトポルフィリンIXによってスーパーオキシドが発生するという報告もある(Buettner & Oberley, 1979)。現在までに、一重項酸素に対する消去系は発見されておらず、もし、VS200株で発生する活性酸素が一重項酸素であるとしたら、この株の可視光感受性を利用することによって、新たな活性酸素の消去系が見い出されるかもしれない。現在、筆者の研究室において、VS200株を用いて、活性酸素による細胞の致死に参与する遺伝子を同定する研究を行っているところである。具体的には、VS200株の可視光に対する復帰変異株から、これまで見い出されたようなヘム生合成系の前段階の遺伝子の変異株は除いて、たとえばプロトポルフィリンIXが蓄積していても光に非感受性であるといった復帰変異株を分離して、その復帰変異の原因となっている遺伝子がどのような働きをしているかを解析しようとしている。

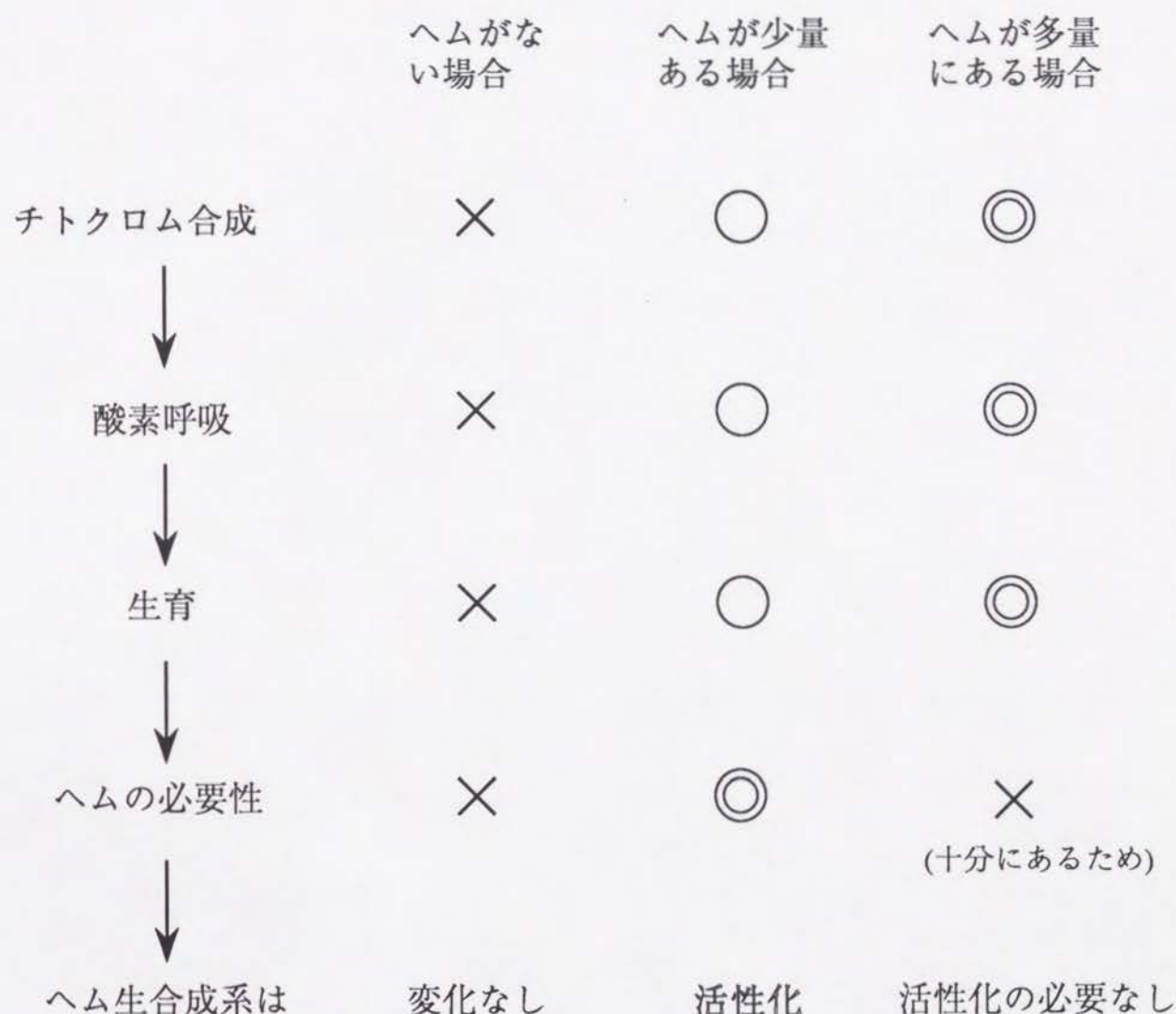


図26 ヘムの存在量によるヘム生合成系の活性化の機構

ヘムの存在量によって、ヘム生合成系が活性化されたり、活性化が起らなかったりする機構の仮説をまとめた。

ヘムが存在しない場合 — 酸素呼吸そのものが開始できずにヘム生合成系は活性化されない。

ヘムが少量存在する場合 — 酸素呼吸が開始できるがヘムが不足する状態になりヘム生合成系が活性化する。

ヘムが多量存在する場合 — 酸素呼吸に必要なだけのヘムがすでに存在しているのでヘム生合成系は活性化されない。

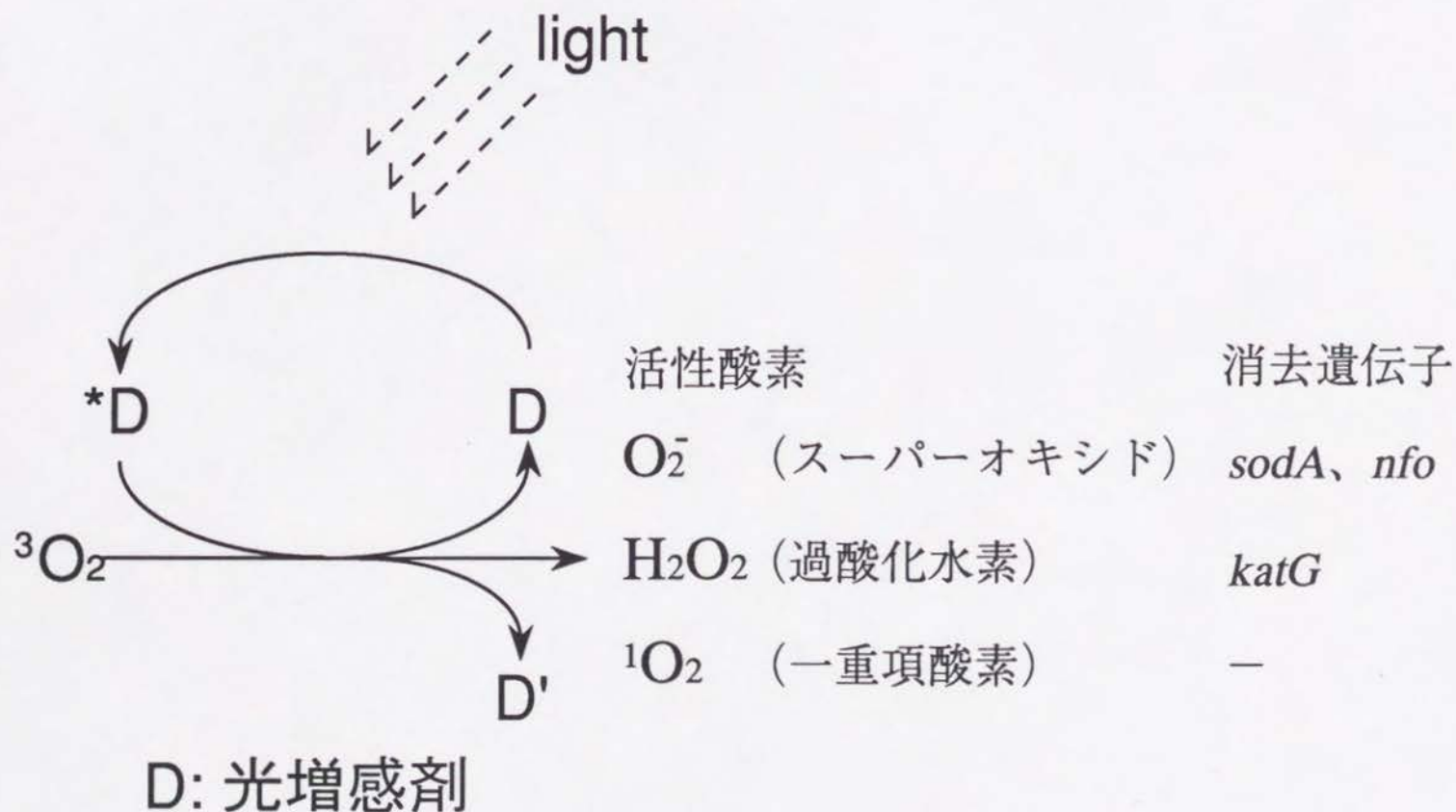


図27 光による活性酸素の発生とその消去系

光による活性酸素の発生を模式図に表わした。活性酸素にはスーパーオキシド、過酸化水素、一重項酸素などがある。スーパーオキシド、過酸化水素には消去系の遺伝子が知られているが、一重項酸素に対する消去系は現在のところ知られていない。

第二節 大腸菌フェロキレテースの精製

第二節では大腸菌フェロキレテースの大量発現系を構築し、発現された酵素を大量に精製した。それとともに、精製酵素標品を用いて大腸菌フェロキレテースについて様々な生化学的性質を調べた。

まず、発現ベクターpJLA503に、*visA*遺伝子を挿入したpFC3を作成し、大量発現のためのプラスミドとした。つい最近、T7プロモーターを用いた、大腸菌のフェロキレテースの大量発現が報告された(Furstaci *et al.*, 1993)。このことより、大腸菌のフェロキレテースの大量発現には必ずしも λ ファージのプロモーターの系である必要はないものと思われる。しかし、筆者は、当初ベクターに*tac*プロモーターを持つものを用いたが、この場合には十分な発現が見られなかった。この理由は明らかではないが、大量に発現させる蛋白質とベクターの種類によって、大量に発現する場合とあまり発現しない場合があることは確かである。pFC3プラスミドを用いて発現を誘導した、約35kDの蛋白質をSDS-PAGEで分離して(図9)、ウエスタンブロッティングしてバンドを切り出した。この蛋白質のN末端のアミノ酸配列を解析し(図18)、この約35kDの蛋白質が確かにフェロキレテースであることを確認した。

大腸菌のフェロキレテースが大量発現されたことが確認されたので、その精製に取りかかったが、まず、フェロキレテースが可溶性か不溶性かを調べるために、大腸菌体を超音波によって破碎し、可溶性分画と不溶性分画に分けSDS-PAGEで解析したところ、どちらの分画にもフェロキレテースのバンドが見られた。T7の系で発現されたフェロキレテースはほとんどが不溶性分画に見られたと報告されている(Furstaci *et al.*, 1993)。ただし、大腸菌のフェロキレテースはアミノ酸配列の情報から可溶性であるという指摘もあり、大腸菌のフェロキレテースは、本来は可溶性であるのだが、菌体内に大量に発現させているために、凝集しやすくなっているものと考えている。結晶化のためには可溶化したサンプルが必要なのでBrij35による可溶化を行った。

Brij35を用いた理由の一つはOD測定時に吸収が少ないことであり、Triton X-100などは吸収が非常に大きくて、ODによる蛋白質濃度の測定によって、精製時にどの分画に蛋白質が多いかを比較することが不可能であり、すべてのフラクションをSDS-PAGEによってチェックしなければならなくなるからである。

可溶化されたフェロキレテースを硫酸アンモニウムによる塩析によって分画した。「結果」で述べたようにフェロキレテースが沈殿とならず浮遊物として分離されたということは、硫酸分画の段階でのフェロキレテースを含むサンプルは何らかの脂質を含んでいる可能性を示唆している。哺乳類ではフェロキレテースはミトコンドリア内膜に存在することが明らかになっており (Jones & Jones, 1969; Taketani & Tokunaga, 1980; Senjo *et al.*, 1985)、大腸菌フェロキレテースも膜構造を作っているような脂質と結合しやすいのかもしれない。ただし、大腸菌フェロキレテースは必ずしも膜蛋白であるとは限らない。

カラムによる精製では、Blue Sepharose CL-6Bが最も良く用いられているが、他のカラムでも精製を試みている。DEAEカラムによる精製は、ある程度の精製は行えたが、他の蛋白質の混入が多く、Blue Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィーによる精製の範囲に含まれてしまうので、最終的にはDEAEは用いなくても十分である。疎水性カラム(Phenyl Sepharose CL-4B)による疎水クロマトグラフィーも行ったが、この場合もDEAEを用いるよりは純度が上がったが、Blue Sepharose CL-6B程ではなく、やはりBlue Sepharose CL-6Bによる精製で十分補えるものであり、最終的には用いなかった。結局はカラムによる精製の段階ではBlue Sepharose CL-6Bだけを用いたが、なぜBlue Sepharose CL-6Bにフェロキレテースが良く吸着するのかは、現在まで明らかにされていない。Blue Sepharose CL-6Bを用いて、様々な種からフェロキレテースが精製されている (bovine liver: Taketani & Tokunaga, 1982; Dailey & Fleming, 1983; bovine kidney: Nakahashi *et al.*, 1990a; mouse liver: Dailey *et al.*,

1986c: human liver: Mathews-Roth *et al.*, 1987: chicken erythrocytes: Hanson & Dailey, 1984: yeast: Camadro & Labbe, 1988: photosynthetic bacteria: Dailey, 1982)。最近の精製の報告はBlue Sepharose CL-6Bによるもののみで、他のカラムを使用した精製は報告されていない。Red Sepharose CL-6Bやリン脂質・ポルフィリン結合カラム(Taketani, 1993)、パルミチン酸結合カラム(Camadro & Labbe, 1988)での精製も試みられているが、フェロキレテースは結合しないことが報告されている。よって、他の種のフェロキレテースの場合でもBlue Sepharose CL-6Bでの精製度以上に精製できるカラムは現在のところ見つかっていない。

Sephacryl S-300カラムクロマトグラフィーによって、大腸菌フェロキレテースの分子量は約35000と推定された。ところが、コール酸ナトリウムのない条件で行うと、この酵素はblue dextranと同じ所で溶出し、コール酸ナトリウム非存在下では非常に凝集しやすいことがわかった。同様のことは、過去にも報告されており(Taketani & Tokunaga, 1981)、フェロキレテースの分子量の特定を難しくしていたが、現在では、コール酸ナトリウム存在下では哺乳類のフェロキレテースの分子量は約40~42kDとされていて、フェロキレテースは単量体で働いているとされている。唯一、例外として、光合成細菌(*Rhodopseudomonas sphaeroides*; Dailey, 1982)では分子量約115kDで単量体であると報告されている。大腸菌の場合も、分子量やコール酸ナトリウム存在下で溶出した酵素でも活性が保持されていたという事実から、フェロキレテースは単量体で働いていることを示していると思われる。このことは、フェロキレテースでは、一分子内に鉄イオンおよびプロトポルフィリンIXを認識して保持する部位と、鉄イオンを挿入する活性を持つ部位を持っていることを示しており、複数分子が共同で鉄イオンおよびプロトポルフィリンIXを保持しているのではないことを示している。

精製の各段階のサンプルの活性を測定し、精製の効率を推定した。活性測定の方法は、ラベルした鉄の取り込みをはかる方法(Krueger *et al.*, 1956)、ピ

リジンヘモクローム法(Porra & Jones, 1963a; Taketani & Tokunaga, 1981)、亜鉛プロトポルフィリンIXの生成をHPLCで測定する方法(Rossi *et al.*, 1988)などが報告されているが、ここでは、ピリジンヘモクローム法を用いた。基質には、これまでの報告ではメソポルフィリンがよく使われているが、今回は、本来の基質であるプロトポルフィリンを用いた。比活性を測定したところ、これまでの哺乳類の酵素での報告[3500u (nmol heme formed / 30 min / mg protein): Taketani & Tokunaga, 1981; 2700u: Taketani & Tokunaga, 1982]と比較すると、かなり低い値(290u)が示された。この理由としては、以前の報告とは基質として使ったポルフィリンが違ふことが考えられる。プロトポルフィリンIXはメソポルフィリンIXよりも基質としての取り込みが低いことが知られている (Taketani & Tokunaga, 1982; Dailey & Fleming, 1983; Hanson & Dailey, 1984; Nakahashi *et al.*, 1990a)。フェロキレテースの基質として本来の基質であるプロトポルフィリンIXよりもその類似体であるメソポルフィリンIXの方が認識されやすいということは興味あることである。

また、鉄イオンに対する K_m 値は3.22mMで、これは哺乳類の酵素と比較してかなり高い値である(rat liverで33.1 μ M: Taketani & Tokunaga, 1981; bovine liverで46 μ M: Taketani & Tokunaga, 1982; chicken erythrocyteで166 μ M: Hanson & Dailey, 1984; bovine kidneyで3.51 μ M: Nakahashi *et al.*, 1990a)。この原因としては、精製中のプロテアーゼ活性を阻害するためにEDTAをかなり高い濃度で入れているため、酵素サンプル中に含まれているEDTAによって、鉄イオンの一部が反応溶液中でキレートされてしまっていることが考えられる。今回は、大量に精製サンプルを得ることを目的に精製を行ったので、なるべく分解が起らないようにしたが、金属に対する基質特異性を調べる実験に用いるサンプルはEDTAなしで精製すべきであろう。一方、プロトポルフィリンIXに対する K_m 値は3.77 μ Mで、これは哺乳類の酵素より少し低いレベルの値である(rat liverで28.5 μ M: Taketani & Tokunaga, 1981; bovine liverで54 μ M: Taketani & Tokunaga, 1982; chicken erythrocyteで37 μ M: Hanson & Dailey, 1984;

bovine kidneyで $12.7\mu\text{M}$; Nakahashi *et al.*, 1990a)。

CD測定から大型コンピュータで計算した α -helix約10%、 β -sheet約39%という値は、他の大腸菌の酵素の値(例えば、RNaseHでは α -helix約25%、 β -sheet約41%、Kanaya *et al.*, 1990)と比較すると、 α -helixの含量が少なくなっていて、相対的に β -sheetの多い酵素である。 β -sheetは球状タンパクに相対的に多い構造であり、フェロキレタースは、球状タンパクに近い構造をしているものと考えられる。

第三節 高等植物のフェロキレテースcDNAの解析

大麦およびキュウリ子葉のcDNAライブラリーより分離したクローン(BA1とCU3)の塩基配列の解析の結果、大麦から分離したcDNAクローン(BA1)からは484アミノ酸、キュウリ子葉のcDNAクローン(CU3)からは514アミノ酸をコードするORFが見い出され、大腸菌フェロキレテースとアミノ酸レベルでそれぞれ32.0%、31.4%のホモロジーがあった。また、大麦およびキュウリ子葉のフェロキレテース相互間のホモロジーは、64.8%であった(図24)。これまでに報告されている真核生物(酵母、マウス、ヒト)のフェロキレテース(Labbe-Bois, 1990; Taketani *et al.*, 1990; Nakahashi *et al.*, 1990a)の成熟酵素に関する情報から推測して、大麦およびキュウリ子葉のフェロキレテースの成熟酵素のN末端は、図23に示した矢印の位置の前後にあるものと推測される。

哺乳類の場合にはフェロキレテースはミトコンドリアに存在することが知られている(Harbin & Dailey, 1985)が、植物の場合、この酵素がミトコンドリアにあるか葉緑体にあるかが興味があるところである。ここで、大麦およびキュウリ子葉フェロキレテースの先導ペプチドを、酵母や哺乳類の先導ペプチドと比較すると、植物の場合の先導ペプチドは哺乳類よりも先導ペプチドが長くなっており(図24参照)、植物の先導ペプチドと動物の先導ペプチドとのホモロジーも高くない。また、植物の場合には葉緑体に局在する一部の酵素の中で、保存されている配列が知られている(Konishi *et al.*, 1993)が、フェロキレテースの場合はこれらの配列との相同性も認められない。こうしたことから、現在のところ、このフェロキレテースが、ミトコンドリアにあるものか葉緑体にあるものかははっきりしない。今回、植物のフェロキレテースのアミノ酸配列が判明したので、抗体を作製し、免疫学的手法を駆使することによって、フェロキレテースの局在性等も明らかにできるものと思われる。

さらに、アミノ酸配列のホモロジーから求めたフェロキレテースの進化系統樹(図25)によると、細菌類、動物、植物でそれぞれ近い位置にあり、細菌

類は植物よりも動物と近いことがわかる。ただし、枯草菌だけは原核生物であるにもかかわらず、大腸菌や根粒細菌とはかなり違っていて系統樹上離れた位置にあり、枯草菌は進化の過程で細菌類の中でも早い時期に分化したことを示しているのではないかと思われる。

8種類のフェロキレテースのアミノ酸配列のホモロジーから数箇所はかなり良く保存された領域があることがわかり、これらの領域がフェロキレテースの活性に重要な働きをしているものと考えられる。以前の報告で、フェロキレテースの反応にはシステイン残基が関与していて、鉄イオンを2つのシステインが保持するモデルが示されている(Dailey, 1984; Dailey *et al.*, 1986a)。今回、決定した植物のフェロキレテースを含む8つのフェロキレテースの保存残基には、システインは含まれておらず、このモデルは、全生物のフェロキレテースにはあてはまらないものと思われる。また、同様な報告で、アルギニン残基が重要だという報告もある(Dailey *et al.*, 1986a; Dailey & Fleming 1986b)。この場合には、図23の169番および266番に保存されているアルギニン残基があり、これらの残基が活性を持つ上で何らかの役割をはたしているのかもしれない。ただし、169番の場合は枯草菌の場合には欠失している領域であり、266番の場合も良く保存された領域とは少し離れていて、最も重要な残基ではないと思われる。フェロキレテースの反応に重要な領域は全生物のフェロキレテースで保存されているとすれば、8つのフェロキレテースでよく保存されている115番～129番、185番～189番、249番～259番、332番～335番、369番～380番、401番～415番の辺りの領域がフェロキレテースの活性に重要な役割をしているものと思われる。

筆者らが以前分離した大腸菌の可視光感受性株(VS101～VS104)の変異位置(Miyamoto *et al.*, 1991)は、図23に当てはめると124番(大腸菌フェロキレテースでは14番目)のグリシンがセリンに(VS101の場合)、126番(同16番目)のプロリンがセリンに(VS102場合)、245番(同124番目)のバリンがメチオニンと424番(同292番目)のグリシンがアスパラギン酸に(VS103の場合)、424番(同292番

目)のグリシンがアスパラギン酸に(VS104の場合)に変化している。この内、124番目のグリシンと126番目のプロリンは共に8つのフェロキレテースで完全に保存されており、重要なアミノ酸残基であると考えられる。他の二つも保存領域の前後にあり、フェロキレテースの活性に何らかの役割をはたしているものと思われる。ただし、VS101～VS104の変異株は生育は野生型なみに良いことから少しはヘムが作られていて、プロトポルフィリンIXも蓄積している部分欠損の株であると考えている。したがって、VS101～VS104での変異位置は、最も重要な残基からは少し離れているものと思われ、最も重要な領域は先に示した保存領域の中にあるものと思われる。

今後、立体構造解析と併せて、これらの保存領域に変異を導入したフェロキレテースを作り、その酵素の性質を解析していくことで、これらの領域の中でどこがポルフィリンとの結合に重要で、どこが鉄イオンとの結合に重要であるか、さらには、その二つの機能以外に重要な領域はあるか、などフェロキレテースの反応機構を解析する上で重要な情報が得られるであろう。

まとめ

以上の研究から、大腸菌の可視光感受性株およびフェロキレテースについて様々なことがわかった。

第一節の大腸菌可視光感受性株の解析では、この可視光感受性株はフェロキレテースの変異によって、前駆体のプロトポルフィリンIXが細胞内に異常に蓄積していることが示された。プロトポルフィリンIXは光増感剤であり、可視光の照射によって、酸素分子からの活性酸素の生成を触媒することが知られている。

第二節では、大腸菌フェロキレテースの大量発現系の構築と精製を行い、4リットルの培養から約90mgの大腸菌フェロキレテースを精製した。精製した酵素は、現在、蛋白工学研究所において結晶化、立体構造解析を行っている。一方、精製した酵素を用いて大腸菌フェロキレテースの生化学的性質の解析を行った。分子量の測定の結果、この酵素の分子量は約35kDであり、この酵素は単量体で働いているものと思われる。等電点・至適pHの測定を行ったところ、等電点はpH4.7、至適pHは8.0であった。CD測定を行い、 α -helixと β -sheetの含量を計算したところ、 α -helixは約10%、 β -sheetは約39%と推定された。

第三節では、植物のフェロキレテースの遺伝子の分離・解析を行った。大麦・キュウリ子葉と二種類のフェロキレテースの遺伝子配列を同時に明らかにしたが、植物でのフェロキレテースの遺伝子の報告は初めてである。フェロキレテースは全生物において、アミノ酸配列上よく保存されている領域があることが示された。これらの保存領域から推測される情報と立体構造解析の結果を合わせて考えることによって、フェロキレテースの高次構造とその反応機構が明らかになるものと思われる。

謝 辞

本研究を行うに当たって、指導教官として、丁寧に御指導くださいました井口八郎先生に深く感謝いたします。

山岸秀夫先生にも研究面を始め様々な御指導、御助言をいただきました、深く感謝いたします。

蛋白工学研究所の金谷茂則博士、森川耿右博士には大腸菌フェロキレテースの精製の研究において様々な御指導、御助言をいただきました、感謝いたします。

関西医科大学の竹谷茂博士にはフェロキレテースの活性測定その他において御協力、御助言をいただきました、感謝いたします。

植物学教室の辻英夫先生、田中亮一氏、寺本陽彦氏、増田建氏（現東京工大）には大麦およびキュウリ子葉のcDNAライブラリーを分与していただき、また、様々な御指導、御助言をいただきました、感謝いたします。

また、研究においても、その他の面でも様々な、御協力、御助言をいただき、楽しい研究生活を過ごさせていただきました分子生物学講座の皆様に感謝いたします。

なお、本研究のうち大腸菌フェロキレテースの精製に関しては蛋白工学研究所との共同研究であり、実験は蛋白工学研究所にて行いました。

最後に、大学院生活の間、様々な援助をしてくれ、精神的にも支えてくださいました両親および婚約者の小林美穂さんに感謝いたします。

参考文献

Allison, A. C., Magnus, I. A. & Young, M. R. (1966) Role of lysosomes and of cell membranes in photosensitization. *Nature* **209**, 874-878.

Ausebel, F. L., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & K., S. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Massachusetts general hospital; Harvard medical school, MA, USA.

浅田 浩二 (1988) 活性酸素の生成・消去・作用. *蛋白質核酸酵素* **33**, 2659-2664.

Bachmann, B., J. (1990) Linkage map of *Escherichia coli* K-12, Edition 8. *Microbiol. Rev.* **54**, 130-197.

Bloomer, J. R., Hill, H. D., Morton, K. O., Anderson-Burnham, L. A. & Straka, J. G. (1987) The enzyme defect on bovine protoporphyria. *J. Biol. Chem.* **262**, 667-671.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brenner, D. A., Didier, J. M., Frasier, F., Christensen, S. R., Evans, G. A. & Dailey, H. A. (1992) A molecular defect in human protoporphyria. *Am. J. Hum. Genet.* **50**, 1203-1210.

Buettner, G., R. & Oberley, L., W. (1979) Superoxide formation by

protoporphyrin as seen by spin trapping. *FEBS Lett.* **98**, 18-20.

Camadro, J.-M. & Labbe, P. (1988) Purification and properties of ferrochelatase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**, 11675-11682.

Chartnrad, P., Tardif, D. & Săsărman, A. (1979) Uroporphyrin- and coproporphyrin I-accumulating mutant of *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **110**, 61-66.

Cox, R. & Charles, H. P. (1973) Porphyrin-accumulating mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **113**, 122-132.

Dailey, H. A. (1982) Purification and characterization of membrane-bound ferrochelatase from *Rhodopseudomonas syhaeroides*. *J. Biol. Chem.* **257**, 14714-14718.

Dailey, H. A. & Fleming, J. E. (1983) Bovine ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* **258**, 11453-11459.

Dailey, H. A. (1984) Effect of sulfhydryl group modification on the activity of bovine ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* **259**, 2711-2715.

Dailey, H. A., Fleming, J. E. & Harbin, B. M. (1986a) Ferrochelatase from *Rhodopseudomonas sphaeroides*: Substrate specificity and role of sulfhydryl and arginyl residues. *J. Bacteriol.* **165**, 1-5.

Dailey, H. A. & Fleming, J. E. (1986b) The role of arginyl residues in porphyrin

binding to ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* **261**, 7902-7905.

Dailey, H. A., Fleming, J. E. & Harbin, B. M. (1986c) Purification and characterization of mammalian and chicken ferrochelatase. *Methods Enzymol.* **123**, 401-407.

Dailey, H. A. (1990) *Biosynthesis of Heme and Chlorophylls*. McGraw-Hill Publishing Company, NY, USA.

Deybach, J. C., Silva, V. D., Pasquier, Y. & Nordmann, Y. (1986) In Nordmann Y. (eds.), *Porphyrin and Porphyrins*. Libbey, London, pp. 163-173.

Drolet, M., Peloquin, L., Echelard, Y., Cousineau, L. & Săsarman, A. (1989) Isolation and nucleotide sequence of the *hemA* gene of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **216**, 347-352.

Echelard, Y., Dymetriszyn, J., Drolet, M. & Săsarman, A. (1988) Nucleotide sequence of the *hemB* gene of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **214**, 503-508.

Frustaci, J. M. & O'brian, M. R. (1992) Characterization of a *Bradyrhizobium japonicum* ferrochelatase mutant and isolation of the *hemH* gene. *J. Bacteriol.* **174**, 4223-4229.

Frustaci, J. M. & O'brian, M. R. (1993) The *Escherichia coli* *visA* gene encodes ferrochelatase, the final enzyme of the heme biosynthetic pathway. *J. Bacteriol.* **175**, 2154-2156.

- Fuesler, T. P., Castelfranco, P. A. & Wong, Y.-S. (1984a) Formation of Mg-containing chlorophyll precursors from protoporphyrin IX, δ -aminolevulinic acid, and glutamate in isolated, photosynthetically competent, developing chloroplast. *Plant Physiol.* **74**, 928-933.
- Fuesler, T. P., Wong, Y.-S. & Castelfranco, P. A. (1984b) Localization of Mg-chelatase and Mg-protoporphyrin IX monomethyl ester (oxidative) cyclase activities within isolated, developing cucumber chloroplast. *Plant Physiol.* **75**, 662-664.
- Fukuzawa, H., Kohchi, T., Sano, T., Shirai, H., Umesono, K., Inokuchi, H., Ozeki, H. & Ohyama, K. (1988) Structure and organization of *Marchantia polymorpha* chloroplast genome. III. Gene organization of the large single copy region from *rbcL* to *trnI*(CAU). *J. Mol. Biol.* **203**, 333-351.
- Gibson, K. D., Laver, W. D. & Neuberger, A. (1958) Initial stages in the biosynthesis of porphyrins. II. Formation of δ -aminolevulinic acid from glycine and succinyl CoA by particles from chicken erythrocytes. *Biochem. J.* **61**, 618-620.
- Hanson, J. W. & Dailey, H. A. (1984) Purification and characterization chicken erythrocyte ferrochelatase. *Biochem. J.* **222**, 695-700.
- Hansson, M. & Hederstedt, L. (1992) Cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* *hemEHY* gene cluster, which encodes protoheme IX biosynthetic enzymes. *J. Bacteriol.* **174**, 8081-8093.
- Harbin, B. M. & Dailey, H. A. (1985) Orientation of ferrochelatase in bovine liver

mitochondria. *Biochemistry* **24**, 366-370.

Hsu, J., Goldstein, B., D. & Harber, L., C. (1971) Photoreactions associated with *in vitro* hemolysis in erythropoietic protoporphyria. *Photochem. Photobiol.* **13**, 67-77.

Ilag, L. L., Jahn, D., Eggertsson, G. & Söll, D. (1991) The *Escherichia coli* *hemL* gene encodes glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *J. Bacteriol.* **173**, 3408-3413.

伊藤 敦 & 伊藤 隆 (1988) 可視光・紫外光 ー光増感過程による活性酸素の生成ー. *蛋白質核酸酵素* **33**, 2795-2802.

Jahn, D., Micheles, U. & Söll, D. (1991) Two Glutamyl-tRNA Reductase Activities in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 2542-2548.

Jones, M. S. & Jones, O. T. G. (1969) The structural organization of heam synthesis of rat liver mitochondria. *Biochem. J.* **113**, 507-514.

Jordan, P. M., Mgbeje, B. I. A., Thomas, S. D. & Alwan, A. F. (1988) Nucleotide sequence for *hemD* gene of *Escherichia coli* encoding uroporphyrinogen III synthase and initial evidence for a hem operon. *Biochem. J.* **249**, 613-616.

Kanaya, S. & Uchida, T. (1986) Comparison of the primary structures of ribonuclease U2 isoforms. *Biochem. J.* **240**, 163-170.

Kanaya, S., Kohara, A., Miura, Y., Sekiguchi, A., Iwai, S., Inoue, H., Ohtsuka, E.

& Ikehara, M. (1990) Identification of the amino acid residues involved in an active site of *Escherichia coli* ribonuclease H by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **265**, 4615-4621.

Kanaya, S. & Itaya, M. (1992) Expression, purification, and characterization of a recombinant ribonuclease H from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Biol. Chem.* **267**, 10184-10192.

Kappas, A., Sassa, S. & Anderson, K. E. (1983) In Stanbury J. B., Wynagaarden J. B., Fredrickson D. S., Goldstein J. L. & Brown M. S. (eds.), *The metabolic basis of inherited disease*. McGraw-Hill Publishing Company, NY, USA.

Kohchi, T., Shirai, H., Fukuzawa, H., Sano, T., Komano, T., Umesono, K., Inokuchi, H., Ozeki, H. & Ohyama, K. (1988) Structure and organization of *Marchantia polymorpha* chloroplast genome. IV. Inverted repeat and small single copy region. *J. Mol. Biol.* **203**, 353-372.

Konishi, T., Maruta, Y., Shinohara, K. & Watanabe, A. (1993) Transit peptides of thylakoid luminal proteins: the sites of stromal processing are conserved among higher plants. *Plant Cell Physiol.* **37**, 1081-1087.

Kouji, H., Masuda, T. & Matsunaka, S. (1989) Action mechanism of diphenyl ether herbicides; stimulation of 5-aminolevulinic acid-synthesizing system activities. *Pestic. Biochem. Physiol.* **33**, 230-238.

Krasnovsky, J. A. A. (1979) Photoluminescence of singlet oxygen in pigment solutions. *Photochem. Photobiol.* **29**, 29-36.

- Krueger, R. C., Melnick, I. & Klein, J. R. (1956) Formation of heme by broken-cell preparations of duck erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.* **64**, 302-310.
- Labbe-Bois, R. (1990) The ferrochelatase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **265**, 7278-7283.
- Lamoril, J., Boulechfar, S., Verneuil, H. d., Grandchamp, B., Nordmann, Y. & Deybach, J. (1991) Human erythropoietic protoporphyria: Two point mutations in the ferrochelatase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **181**, 594-599.
- Langhof, H., Muller, H. & Reitschel, I. (1961) Untersuchungen zur familiaren protoporphyrinamischen lichurticaria. *Arch. Klin. Exp. Dermatol.* **212**, 506-518.
- Leong, S. A., Ditta, G. S. & Helinski, D. R. (1982) Heme biosynthesis in *Rhizobium*: identification of a cloned gene coding for δ -aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* **257**, 8724-8730.
- Li, J.-M., Umanoff, H., Proenca, R., Russell, C. S. & Cosloy, S. D. (1988) Cloning of the *Escherichia coli* K-12 *hemB* gene. *J. Bacteriol.* **170**, 1021-1025.
- Li, J.-M., Brathwaite, O., Cosloy, S. D. & Russell, C. S. (1989a) 5-Aminolevulinic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 2547-2552.
- Li, J.-M., Russell, C. S. & Cosloy, S. D. (1989b) Cloning and structure of the *hemA* gene of *Escherichia coli* K-12. *Gene*. **82**, 209-217.

- Mangus, I. A., Jarret, A., Prankerd, T. A. J. & Rimington, C. (1961) Erythropoietic protoporphyria: A new porphyria syndrome with solar urticaria due to protoporphyrin-anemia. *Lancet* **2**, 448-451.
- Marver, H. S., Collins, A., Tschudy, D. P. & Rechcigl, J. (1966) δ -aminolevulinic acid synthetase. II. Induction in rat liver. *J. Biol. Chem.* **241**, 4323-4329.
- Masuda, T., Kouji, H. & Matsunaka, S. (1990) Diphenyl ether herbicide-decreased heme contents stimulate 5-aminolevulinic acid synthesis. *Pestic. Biochem. Physiol.* **36**, 106-114.
- Matthews-Roth, M. M., Durouin, G. L. & Duffy, L. (1987) Isolation of human ferrochelatase. *Arch. Dermatol.* **123**, 429-430.
- Miyamoto, K., Nakahigashi, K., Nishimura, K. & Inokuchi, H. (1991) Isolation and characterization of visible light-sensitive mutants of *Escherichia coli* K12. *J. Mol. Biol.* **219**, 393-398.
- Miyamoto, K., Nishimura, K., Masuda, T., Tsuji, H. & Inokuchi, H. (1992) Accumulation of protoporphyrin IX in light-sensitive mutants of *Escherichia coli*. *FEBS letters* **310**, 246-248.
- Miyamoto, K., Kanaya, S., Morikawa, K. & Inokuchi, H. Overproduction, purification and characterization of ferrochelatase from *Escherichia coli*. *J. Biochem.* accepted.
- Miyamoto, K., Tanaka, R., Teramoto, H., Masuda, T., Tsuji, H. & Inokuchi, H.

Nucleotide sequences of cDNA clones encoding ferrochelatase from barley and cucumber. *Plant Physiol.* submitted.

Nakahashi, Y., Taketani, S., Sameshima, Y. & Tokunaga, R. (1990a)
Characterization of ferrochelatase in kidney and erythroleukemia cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **1037**, 321-327.

Nakahashi, Y., Taketani, S., Okuda, M., Inoue, K. & Tokunaga, R. (1990b)
Molecular cloning and sequence analysis of cDNA encoding human ferrochelatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **173**, 748-755.

Nakahigashi, K., Komine, Y., Watanabe, M. & Inokuchi, H. (1990) An *E. coli* promoter that is sensitive to visible light. *Jap. J. Genet.* **65**, 381-386.

Nakahigashi, K., Nishimura, K., Miyamoto, K. & Inokuchi, H. (1991)
Photosensitivity of a protoporphyrin-accumulating, light-sensitive mutant (*visA*) of *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10520-10524.

Nakahigashi, K., Miyamoto, K., Nishimura, K. & Inokuchi, H. (1992) Isolation and Characterization of a light-sensitive mutant of *Escherichia coli* K-12 with a mutation in a gene that is required for the biosynthesis of ubiquinone. *J. Bacteriol.* **174**, 7352-7359.

Nakamura, Y. & Yura, T. (1975) Evidence for a positive regulation of RNA polymerase synthesis in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **97**, 621-642.

Niederhoffer, E. C., Naranjo, C. M., Bradley, K. L. & Fee, J. A. (1990) Control of

Escherichia coli superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.* **172**, 1930-1938.

Nishimura, K., Nakayashiki, T. & Inokuchi, H. (1993) Cloning and sequencing of the *hemE* gene encoding uroporphyrinogen III decarboxylase (UPD) from *Escherichia coli* K-12. *Gene* **133**, 109-113.

O'Neill, G. P. & Söll, D. (1990) Transfer RNA and the formation of the heme and chlorophyll precursor, 5-aminolevulinic acid. *BioFactors* **2**, 227-235.

Ohyama, K., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Sano, T., Sano, S., Shirai, H., Umesono, K., Shiki, T., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H. & Ozeki, H. (1988) Structure and organization of *Marchantia polymorpha* chloroplast genome. I. Cloning and gene identification. *J. Mol. Biol.* **203**, 281-298.

折井 豊 (1988) ポルフィリン症. 蛋白質核酸酵素 **33**, 3079.

Pardo, A. D., Chereskin, B. M., Castelfranco, P. A., Franceschi, V. R. & Wezelman, B. E. (1980) ATP requirement for Mg chelatase in developing chloroplasts. *Plant Physiol.* **65**, 956-960.

Porra, R. J. & Jones, O. T. G. (1963) Studies on ferrochelatase; 1. Assay and properties of ferrochelatase from a pig-liver mitochondrial extract. *Biochem. J.* **87**, 181-185.

Porra, R. J. & Jones, O. T. G. (1963) Studies on ferrochelatase; 2. An investigation of the role of ferrochelatase in the biosynthesis of various heme prosthetic groups.

Biochem. J. **87**, 186-191.

Poulson, R., Whitlow, K. J. & Polglase, W. J. (1976) Catabolite repression of protoporphyrin IX biosynthesis in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Lett.* **62**, 351-353.

Powell, K. A., Cox, R., McConville, M. & Charles, H. P. (1973) Mutations affecting porphyrin biosynthesis in *Escherichia coli*. *Enzyme* **16**, 65-73.

Provencher, S. W. & Glöckner, J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* **20**, 33-37.

Richter, H. E. & Loewen, P. C. (1981) Induction of catalase in *Escherichia coli* by ascorbic acid involves hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **100**, 1039-1046.

Rossi, E., Costin, K. A. & Garcia-Webb, P. (1988) Ferrochelatase activity in human lymphocytes, as quantified by a new high-performance liquid-chromatographic method. *Clin. Chem.* **34**, 2481-2485.

Russell, R. L., Abelson, J. N., Landy, A., Gefter, M. L., Brenner, S. & Smith, J. D. (1970) Duplicate genes for tyrosine transfer RNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **47**, 1-13.

Ruth, G. R., Schwartz, S., Stephenson, B., Bathes, F. & Shave, H. (1978) A new disease of cattle-bovine protoporphyria: Clinical and diagnostic features. *Am. Assoc. Vet. Lab. Diag.* **21st** Ann. Proc., 91-96.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning "A laboratory manual"*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, MA, USA.
- Sasake, K., Okeda, S., Nishizawa, Y. & Hayashi, M. (1987) Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Ferment. Technol* **65**, 511-515.
- Săsărman, A., Surdeanu, M., Szégli, G., Horodniceanu, T., Greceanu, V. & Dumitrescu, A. (1968a) Hemin-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **96**, 570-572.
- Săsărman, A., Suredeanu, M. & Horodniceanu, T. (1968b) Locus determining the synthesis of δ -aminolevulinic acid in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **96**, 1882-1884.
- Săsărman, A., Chartrand, P., Proschek, R., Desrochers, M., Tardif, D. & Lapointe, C. (1975) Uroporphyrin-accumulating mutant of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **124**, 1205-1212.
- Săsărman, A., Chartrand, P., Lavoie, M., Tardif, D., Proschek, R. & Lapointe, C. (1979) Mapping of a new heme gene in *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.* **113**, 297-303.
- Săsărman, A., Nepveu, A., Echelard, Y., Dymetriszyn, J., Drolet, M. & Goyer, C. (1987) Molecular cloning and sequencing of the *hemD* gene of *Escherichia coli* K-12 and preliminary data on the uro operon. *J. Bacteriol.* **169**, 4257-4262.

- Schauder, B., Blocker, H., Frank, R. & McCarthy, J. E. G. (1987) Inducible expression vectors in incorporating the *Escherichia coli atpE* translational initiation region. *Gene (Amst.)* **52**, 279-283.
- Senjo, M., Ishibashi, T. & Imai, Y. (1985) Purification and characterization of cytosolic liver protein facilitating heme transport into apocytochrome bs from mitochondria. Evidence for identifying the heme transfer protein as belonging to a group of glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **260**, 9191-9196.
- Smith, B. B. & Rebeiz, C. A. (1977) Chloroplast biogenesis: detection of Mg-protoporphyrin chelatase *in vitro*. *Arch. Biochem. Biophys.* **180**, 178-185.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1980) Heme transport from rat liver mitochondria to the microsomes *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **92**, 1343-1347.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1981) Rat Liver Ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* **256**, 12748-12753.
- Taketani, S. & Tokunaga, R. (1982) Purification and substrate specificity of bovine liver-ferrochelatase. *Eur. J. Biochem.* **127**, 443-447.
- Taketani, S., Nakahashi, Y., Osumi, T. & Tokunaga, R. (1990) Molecular cloning, sequencing, and expression of mouse ferrochelatase. *J. Biol. Chem.* **265**, 19377-19380.
- Taketani, S. (1993) Molecular and genetic characterization of ferrochelatase. *Tohoku J. Exp. Med.* **171**, 1-20.

- Thomas, M., Cameron, J. R. & Davis, R. W. (1974) Viable molecular hybrids of bacteriophage lambda and eukaryotic DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **71**, 4579-4583.
- Thomas, S. D. & Jordan, P. M. (1986) Nucleotide sequence of the *hemC* locus encoding porphobilinogen deaminase of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.* **14**, 6215-6226.
- Tutois, S., Montagutali, X., Silva, V. D., Jouault, H., Rouyer-Fessard, P., Leroy-Viard, K., Guenet, J., Nordmann, Y., Beuzard, Y. & Deybach, J. (1991) Erythropoietic protoporphyria in the house mouse. A recessive inherited ferrochelatase deficiency with anemia, photosensitivity, and liver disease. *J. Clin. Invest.* **88**, 1730-1736.
- Umesono, K., Inokuchi, H., Shiki, T., Takeuchi, M., Chang, Z., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Ohyama, K. & Ozeki, H. (1988) Structure and organization of *Marchantia polymorpha* chloroplast genome. II. Gene organization of the large single copy region from *rps* to *atpB*. *J. Mol. Biol.* **203**, 299-331.
- Vesterberg, O. (1971) Isoelectric focusing of proteins. *Methods Enzymol.* **22**, 389-412.
- Vieira, J. & Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **153**, 3-11.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning

vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors.

Gene **33**, 103-119.

米井 修治 & 泉 忠秀 (1988) 酸素ストレスによる適応応答とその機構. *蛋白質核酸酵素* **33**, 3169-3183.